

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Experimentelle Herz-Kreislaufforschung

Institutsdirektor Prof. Dr. rer. nat. Viacheslav Nikolaev

Die Knockoutierung von Phosphodiesterasen 2 und 3 in primären Rattenkardiomyozyten mittels CRISPR/Cas9 und Untersuchung derer Funktion

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Egor Borisovitsch Skryabin
aus Münster

Hamburg 2024

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.02.2025**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Arne Hansen

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Lucie Carrier
Prof. Boris Fehse**

Meinen Eltern, meiner Schwester

Diese Arbeit wurde publiziert:

CRISPR/Cas9 Knock-Out in Primary Neonatal and Adult Cardiomyocytes Reveals Distinct cAMP Dynamics Regulation by Various PDE2A and PDE3A Isoforms. *Cells*, 2023. 12(11).

[1]

Egor B. Skryabin, Kirstie A. De. Jong, Hariharan Subramanian, Nadja I. Bork, Alexander Froese, Boris V. Skryabin, Viacheslav O. Nikolaev

Redner in wissenschaftlichen Kongressen:

Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases, *Gordon Research Conference, Juni 19 - 24, 2022*

Diese Arbeit wurde unter anderem in Zusammenarbeit mit dem Graduiertenkolleg 2020 – 2021 "Cardiovascular Research Center (CVRC)" geschrieben.

INHALTSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS	6
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	8
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1. EINLEITUNG	11
1.1 KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN: PHYSIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE	11
1.1.1 <i>Signalübertragungswege im Herzen</i>	11
1.1.2 <i>Kompartimentierung</i>	12
1.1.3 <i>PDE-Lokalisation und Funktion</i>	13
1.1.4 <i>cAMP- und cGMP-crosstalk im Herzen</i>	14
1.1.5 <i>PDE2A</i>	14
1.1.6 <i>PDE3A</i>	17
1.2 CRISPR/Cas9, EINE PRÄZISE TECHNIK FÜR GENOM-EDITIERUNG	19
1.3 FRET, EINE METHODE ZUR MESSUNG VON cAMP IN LEBENDEN ZELLEN	21
1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	23
1.4.1 <i>Etablierung einer auf CRISPR/Cas9 basierten Methode zur Knockoutierung spezifischer Isoformen in primären Zellen</i>	23
1.4.2 <i>Untersuchung der Funktion von PDE2A und PDE3A Isoformen in adulten und neonatalen Kardiomyozyten</i>	23
2 MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 MATERIAL	24
2.1.1 <i>Tierhaltung</i>	24
2.1.2 <i>Eukaryotische Zelllinien</i>	24
2.1.3 <i>Bakterienstämme</i>	24
2.1.4 <i>Zellkultur</i>	24
2.1.5 <i>Oligonukleotide</i>	25
2.1.6 <i>Plasmide</i>	27
2.1.7 <i>Antikörper</i>	27
2.1.8 <i>Chemikalien und Substanzen</i>	28
2.1.9 <i>Enzyme und Kits</i>	29
2.1.10 <i>Verbrauchsmaterial</i>	30
2.1.11 <i>Ausstattung zum Mikroskop</i>	30
2.1.12 <i>Apparatur</i>	31
2.1.13 <i>Software</i>	31
2.1.14 <i>Lösungen und Puffer</i>	32
2.2 METHODEN	41
2.2.1 <i>gRNS Design</i>	41
2.2.2 <i>Primer Design</i>	42
2.2.3 <i>Klonierung der gRNS</i>	42
2.2.4 <i>Gateway LR Rekombination</i>	45
2.2.5 <i>Adenovirale Amplifikation und Purifizierung</i>	47
2.2.6 <i>Kontrolle der Viren</i>	48
2.2.7 <i>Zellkultur Techniken</i>	49
2.2.8 <i>Organentnahme und Isolation adulter KM</i>	50
2.2.9 <i>Organentnahme und Isolation neonataler KM</i>	50
2.2.10 <i>Fluoreszenzkontrolle transduzierter KM</i>	51
2.2.11 <i>Nachweis eines KO auf Ebene der RNS</i>	51
2.2.12 <i>Nachweis eines KO auf Ebene der DNS</i>	52
2.2.13 <i>Nachweis eines KO auf Proteinebene</i>	54
2.2.14 <i>FRET</i>	55
2.2.15 <i>Statistische Analyse</i>	55
2.2.16 <i>Expression der Isoformen</i>	56

3 ERGEBNISSE	57
3.1 EXPRESSION DER ISOFORMEN	57
3.1.1 <i>Expression von PDE2A- und PDE3A-Isoformen in neonatalen Kardiomyozyten</i>	57
3.1.2 <i>Expression von PDE2A- und PDE3A-Isoformen in adulten Kardiomyozyten</i>	58
3.2 GRNS DESIGN	58
3.3 KLONIERUNG UND HERSTELLUNG VON VIREN	60
3.3.1 <i>Klonierung der gRNS in Plasmide pDNR221_U6gRNA</i>	60
3.3.2 <i>LR-Rekombination in den Virus expressierenden pAD-Vektor</i>	60
3.3.3 <i>Kontrolle der Viren mittels Lyse, PCR, Gelelektrophorese und Sequenzierung</i>	61
3.4 KO IN NEONATALEN KARDIOMYOZYTEN	62
3.4.1 <i>Bestimmung der optimalen KO-Bedingungen</i>	62
3.4.2 <i>Fluoreszenzkontrolle</i>	64
3.4.3 <i>Kontrolle des KO auf RNS-Ebene</i>	64
3.4.4 <i>Kontrolle des KO auf Ebene der chromosomalen DNS</i>	65
3.4.5 <i>Kontrolle des KO auf Proteinebene</i>	68
3.4.6 <i>Kontrolle auf funktioneller Ebene (FRET)</i>	69
3.5 KO IN ADULTEN KARDIOMYOZYTEN	71
3.5.1 <i>Bestimmung der optimalen Bedingungen für KO</i>	71
3.5.2 <i>Kontrolle des KO auf Proteinebene</i>	72
3.5.3 <i>Kontrolle auf funktioneller Ebene (FRET) und Funktion spezifischer Isoformen</i>	73
3.5.4 <i>Kontrolle der CRISPR/Cas9 Spezifität</i>	76
4 DISKUSSION	78
4.1 <i>Etablierung der auf CRISPR/Cas9 basierenden Methode zur Knockoutierung spezifischer Isoformen in primären Zellen</i>	78
4.2 <i>Funktion von PDE2A und PDE3A und derer spezifischer Isoformen in Herzmuskelzellen</i>	81
4.3 <i>Schlussfolgerung</i>	82
ZUSAMMENFASSUNG	83
ABSTRACT	85
LITERATURVERZEICHNIS	86
APPENDIX	95
DANKSAGUNG	98
LEBENS LAUF	99
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	100

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: RATTENLINIEN	24
TABELLE 2: EUKARYOTISCHE ZELLINIEN	24
TABELLE 3: BAKTERIENSTÄMME	24
TABELLE 4: ZELLKULTUR	24
TABELLE 5: OLIGONUKLEOTIDE	25
TABELLE 6: PLASMIDE	27
TABELLE 7: PRIMÄRE ANTIKÖRPER	27
TABELLE 8: SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER	28
TABELLE 9: CHEMIKALIEN UND SUBSTANZEN	28
TABELLE 10: ENZYME UND KITS	29
TABELLE 11: VERBRAUCHSMATERIAL	30
TABELLE 12: AUSSTATTUNG ZUM MIKROSKOP	30
TABELLE 13: SOFTWARES	31
TABELLE 14: HEK293A KULTURMEDIUM FÜR VIRUSAMPLIFIKATION	32
TABELLE 15: 20% TRITON/PBS	32
TABELLE 16: 20% PEG 8000/2.5M NaCl	32
TABELLE 17: PBS	32
TABELLE 18: 10 x SUCROSE-PUFFER	33
TABELLE 19: 2 x IMDM	33
TABELLE 20: 1.5% AGAROSE	33
TABELLE 21: PLAQUE ASSAY MEDIUM	33
TABELLE 22: HEK293A KULTURMEDIUM	33
TABELLE 23: LB MEDIUM	34
TABELLE 24: SOC MEDIUM	34
TABELLE 25: Amp ¹⁰⁰ AGAROSEPLATTE	34
TABELLE 26: 10x PERFUSIONSPUFFER	34
TABELLE 27: 1x PERFUSIONSPUFFER	35
TABELLE 28: VARDAUNGLÖSUNG	35
TABELLE 29: STOP PUFFER	35
TABELLE 30: CA STOP PUFFER 1	35
TABELLE 31: CA STOP PUFFER 2	35
TABELLE 32: CA STOP PUFFER 3	35
TABELLE 33: VERDAUNGLÖSUNG	36
TABELLE 34: GELATIN	36
TABELLE 35: ARA-C ALIQUOT	36
TABELLE 36: KULTIVIERUNGSMEDIUM 1	36
TABELLE 37: KULTIVIERUNGSMEDIUM 2	36
TABELLE 38: BINDEPuffer	37
TABELLE 39: GUANIDIN WASCHPuffer	37
TABELLE 40: WASCHPuffer	37
TABELLE 41: SDS 20%	37
TABELLE 42: TAE-Puffer (50x)	37
TABELLE 43: 6x LADEPuffer, AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	37
TABELLE 44: 6% PAAG-GEL	38
TABELLE 45: HOMOGENISIERUNGSPuffer STOCK	38
TABELLE 46: HOMOGENISIERUNGSPuffer	38
TABELLE 47: SDS STOP 3x	38
TABELLE 48: 4x TRIS/SDS, pH 6.8	39
TABELLE 49: 4x TRIS/SDS, pH 8.8	39
TABELLE 50: APS	39
TABELLE 51: 10 x SDS LAUPPuffer	39
TABELLE 52: 10 x TRANSFERPuffer	39
TABELLE 53: 1 x TRANSFERPuffer	40
TABELLE 54: 10 x TBS Puffer	40

TABELLE 55: 1x TBS-TWEEN PUFFER.....	40
TABELLE 56: SAMMELGEL	40
TABELLE 57: TRENNGEL	40
TABELLE 58: FRET-PUFFER.....	41
TABELLE 59: GRNS FÜR PDE2A, PDE3A UND DEREN ISOFORMEN.....	42
TABELLE 60: VERSUCHSBEDINGUNGEN 1, PHOSPHORYLIERUNG UND HYBRIDISIERUNG DER OLIGONUKLEOTIDE.....	42
TABELLE 61: VERSUCHSBEDINGUNGEN 2, PHOSPHORYLIERUNG UND HYBRIDISIERUNG DER OLIGONUKLEOTIDE.....	43
TABELLE 62: VERSUCHSBEDINGUNGEN 1, LIGATION	43
TABELLE 63: VERSUCHSBEDINGUNGEN 2, LIGATION	43
TABELLE 64: VERSUCHSBEDINGUNGEN LR REKOMBINATION	45
TABELLE 65: VERSUCHSBEDINGUNGEN RESTRIKTIONSVERDAU	46
TABELLE 66: VERSUCHSBEDINGUNGEN DNS-LINEARISIERUNG	46
TABELLE 67: ADENOVIRALE AMPLIFIKATION	47
TABELLE 68: VERSUCHSBEDINGUNGEN, LYSE DER VIREN	48
TABELLE 69: VERSUCHSBEDINGUNGEN 1, GRADIENT PCR.....	48
TABELLE 70: VERSUCHSBEDINGUNGEN 2, GRADIENT PCR.....	48
TABELLE 71: VERSUCHSBEDINGUNGEN 3, GRADIENT PCR.....	49
TABELLE 72: EPAC1-CAMPS, CAMP BIOSENSOR	50
TABELLE 73: VERSUCHSBEDINGUNGEN 1 ISKRIPT CDNS SYNTHESIS KIT	51
TABELLE 74: VERSUCHSBEDINGUNGEN 2 ISKRIPT CDNS SYNTHESIS KIT.....	51
TABELLE 75: VERSUCHSBEDINGUNGEN 3 ISKRIPT CDNS SYNTHESIS KIT.....	51
TABELLE 76: VERSUCHSBEDINGUNGEN 1 qPCR	52
TABELLE 77: VERSUCHSBEDINGUNGEN 2 qPCR	52
TABELLE 78: VERSUCHSBEDINGUNGEN 1, PREAMPLIFIKATION	52
TABELLE 79: VERSUCHSBEDINGUNGEN 2, PREAMPLIFIKATION	53
TABELLE 80: VERSUCHSBEDINGUNGEN 3, PREAMPLIFIKATION	53
TABELLE 81: VERSUCHSBEDINGUNGEN 1, TAQMAN PCR	53
TABELLE 82: VERSUCHSBEDINGUNGEN 2, TAQMAN PCR	53
TABELLE 83: GELELEKTROPHORESE ZUM NACHWEIS DER EXPRESSION VON PDE2A- UND PDE3A-ISOFORMEN IN NEONATALEN KARDIOMYOZYTEN	56
TABELLE 84: KONTROLLE DER PRIMER	56

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: PDE-FAMILIEN	13
ABBILDUNG 2: PDE2A ISOFORMEN	15
ABBILDUNG 3: FUNKTION VON PDE2	16
ABBILDUNG 4: PDE3A ISOFORMEN	18
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER CRISPR/Cas9 NUKLEASE	20
ABBILDUNG 6: GLEICHUNG ZUR ERMITTLUNG DER EFFIZIENZ VON FRET	21
ABBILDUNG 7: PRINZIP DES FRET	22
ABBILDUNG 8: PDNR221_U6GRNA PLASMID	44
ABBILDUNG 9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER LR-REKOMBINATION	45
ABBILDUNG 10: PAD PLASMID	46
ABBILDUNG 11: EXPERIMENTELLER ABLAUF AM BEISPIEL DES PDE2A-KO IN NEONATALEN KARDIOMYOZYTEN	49
ABBILDUNG 12: GELELEKTROPHORESE ZUM NACHWEIS DER EXPRESSION VON PDE2A- UND PDE3A-ISOFORMEN IN NEONATALEN KARDIOMYOZYTEN	57
ABBILDUNG 13: GELELEKTROPHORESE ZUM NACHWEIS DER EXPRESSION VON PDE2A- UND PDE3A-ISOFORMEN IN ADULTEN KARDIOMYOZYTEN	58
ABBILDUNG 14: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PDE2A UND PDE3A GENS, DEREN mRNS UND DIE EINZELNEN GRNS	59
ABBILDUNG 15: RESTRIKTIONSVERDAU UND GELELEKTROPHORESE	61
ABBILDUNG 16: GELELEKTROPHORESE UND FLUORESZENZKONTROLLE	61
ABBILDUNG 17: EXPRESSION VON CAS9 IN NEONATALEN KARDIOMYOZYTEN	63
ABBILDUNG 18: FLUORESZENZKONTROLLE	64
ABBILDUNG 19: qPCR	65
ABBILDUNG 20: GELELEKTROPHORESE DER CHROMOSOMALEN DNS VON PDE2A UND PDE3A AUS ZELLYSATEN NEONATALER KARDIOMYOZYTEN	66
ABBILDUNG 21: SEQUENZ DER CHROMOSOMALEN DNS VON PDE2A UND PDE3A AUS ZELLYSATEN NEONATALER KO KM	67
ABBILDUNG 22: IMMUNOBLOT VON PDE2A UND PDE3A AUS ZELLYSATEN NEONATALER KARDIOMYOZYTEN	68
ABBILDUNG 23: FRET NEONATALER KM	70
ABBILDUNG 24: IMMUNOBLOT VON CAS9 AUS ZELLYSATEN ADULTER KM	71
ABBILDUNG 25: EXPERIMENTELLER ABLAUF AM BEISPIEL DES PDE3A-KO IN ADULTEN KARDIOMYOZYTEN	72
ABBILDUNG 26: IMMUNOBLOT VON PDE2A UND PDE3A AUS ZELLYSATEN ADULTER KARDIOMYOZYTEN	73
ABBILDUNG 27: FRET ADULTER KM, TOTALER KO	74
ABBILDUNG 28: FRET ADULTER KM, SELEKTIVER KO SPEZIFISCHER ISOFORMEN	75
ABBILDUNG 29: FRET ADULTER KM: KONTROLLE DER CRISPR/Cas9 SPEZIFITÄT	77

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bezeichnung
AC	Adenylatzyklase
AKAP	A-kinase anchoring protein
AMP	5'-Adenosin Monophosphat
AO	Antisense Oligonukleotide
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin-Bindungsstellen
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CFP	Cyan fluorescent protein
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
Cilo	Cilostamid
CNGCs	cyclic nucleotide-gated ion channels
CREB	cAMP response element binding protein
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNS	CRISPR RNS
Cas9	CRISPR-associated proteins
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
ECC	elektromechanische Kopplung
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assays
Epacs	exchange proteins directly activated by cAMP
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
GC	Guanylat Zyklase
GC-A, GC-B	transmembrane GC
GMP	Guanosintriphosphat
GPCR	G Protein gekoppelter Rezeptor
HDR	homology direct repair
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
ICER	inducible cAMP early repressor
ISO	Isoprenalin
KO	Knock out
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
NP	natriuretische Peptide
NCBI	National centre for biotechnology information
NFAT	nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NHEJ	Non-homologous-end joining
NHR1	N-terminale Hydrophobe Region
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	nicht signifikant
PDE	Phosphodiesterase
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G

PLN	Phospholamban
PI3Kγ	Phosphoinositide 3-Kinase- γ
pre-crRNS	Precursor-CRISPR-RNS-Moleküle
RIA	Radioimmunoassays
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodinrezeptor
sGC	lösliche GC
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TALEN	Transkriptionsaktivator-like Effektor Nukleasen
TEMED	Tetramethylethylenediamine
tracrRNS	trans-activating crRNS
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UCSC	University of California, Santa Cruz Genome Browser
ü.n.	über Nacht
WT	Wildtyp
YFP	Yellow fluorescent protein
ZFN	Zink-Finger-Nukleasen

1. EINLEITUNG

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen: Physiologie und Pathophysiologie

Das Herz ist ein muskuläres Organ, welches Blut durch das Kreislaufsystem des Körpers pumpt und somit eine zentrale Rolle für die Lebenserhaltung des Menschen spielt. Wenn sich die Bedürfnisse des Körpers ändern, passen Hormone und Neurotransmitter die Pumpkraft und Pumpleistung des Herzens an, um eine optimale Versorgung aller Gewebe mit Sauerstoff zu gewährleisten[2]. Nach der Bindung an ihren entsprechenden Rezeptor werden diese extrazellulären Stimuli durch intrazelluläre "Second Messenger" in eine Vielzahl spezifischer intrazellulärer Antworten umgewandelt. Die wichtigsten Botenstoffe im Herzen sind zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), die Kontraktion und die Genexpression regulieren.

Es gibt viele Faktoren, die für eine physiologische Reaktion auf den cAMP/cGMP-Signalweg essenziell sind, wie die Kompartimentierung, Aktivität der Phosphodiesterase (PDE) und Second Messenger crosstalk. Eine chronische Hochregulierung des cAMP/cGMP-Signalwegs führt zu pathologischen Umbauprozessen im Herzen, Dekompensation und Herzerkrankungen [3].

1.1.1 Signalübertragungswege im Herzen

Wie bereits erwähnt, sind cGMP und cAMP ubiquitäre Botenstoffe und kommen in jeder Zelle des Körpers vor.

Der cAMP Signalweg

Der cAMP Signalweg wird durch die Bindung eines first messengers an einen G Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) initiiert. Ist dieser GPCR an ein stimulierendes G Protein, G_s , gebunden, wie z.B. β_1 , β_2 , β_3 Adrenorezeptoren, kommt es zur Freisetzung der α -Untereinheit des G Proteins und darauffolgenden Aktivierung einer Adenylylcyclase (AC) welche 5'-Adenosin Triphosphat (ATP) zu cAMP konvertiert.

In KM aktiviert cAMP drei Haupteffektoren: exchange proteins directly activated by cAMP (Epacs), die das Wachstum der Zelle steuern [4], cyclic nucleotide-gated ion channels (CNGCs), welche an der Kontrolle der Herzfrequenz beteiligt sind [5] und Protein Kinase A (PKA) [5]. PKA phosphoryliert wiederum L-Typ Calciumkanäle, den Ryanodinrezeptor (RyR), Phospholamban (PLN), Troponin I und das Myosin- bindenden Protein C, die alle in den Mechanismus der elektromechanischen Kopplung (ECC) involviert sind und einen positiv inotropen und lusitropen Effekt haben [6] [7, 8]. Der cAMP-Signalweg gilt als wichtigster Mechanismus zur Regulierung der Herzaktivität, aber eine chronische Aktivierung dieses Weges kann zu einer Entwicklung und Fortschreitung von Herzerkrankung führen[9]. Der cAMP Signalweg wird durch Phosphodiesterasen terminiert, indem sie cAMP zu AMP hydrolysieren.

cGMP-Signalweg

Guanylatzyklasen (GC) sind eine Familie von Enzymen, die cyclisches Guanosintriphosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) synthetisieren [10-13]. Es gibt zwei Hauptformen: Die lösliche GC (sGC) wird durch NO stimuliert, während die transmembrane GC (GC-A, GC-B) als Rezeptor für natriuretische Peptide fungiert[14-16]. Die wichtigsten Effektorproteine von cGMP sind Proteinkinase G (PKG), cGMP-gesteuerte

Ionenkanäle und PDEs. PKG reguliert im Herzen die ECC durch Unterdrückung der Öffnungswahrscheinlichkeit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals, der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Transientenamplitude und der durch den L-Typ- Ca^{2+} -Kanalstrom induzierten Aktivierung der nuklearen Faktoren aktivierter T-Zellen (NFAT)[17-19]. Darüber hinaus dient Troponin T als Ankerprotein, und Troponin I senkt, wenn es von PKG phosphoryliert wird, die Affinität von Troponin C zum Ca^{2+} [20]. Durch Phosphorylierung von PLN wird die Ca^{2+} -Wiederaufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum erhöht[21].

CNGCs sind ein weiteres Ziel des cGMP-Signalwegs. Ihre Aktivierung kann durch die Bindung von cGMP an die zyklische Nukleotidbindungsdomäne eingeleitet werden[22, 23].

Der cGMP-Signalweg wird durch Phosphodiesterasen (PDEs) beendet[24].

Eine akute cGMP-Signalweg Aktivierung kann positive Prozesse wie Antihypertrophie fördern. Jedoch ist eine abnorme cGMP-vermittelte Signalübertragung charakteristisch für viele Herzerkrankungen wie Ischämien/Reperfusionsschäden und Vorhofflimmern[25].

1.1.2 Kompartimentierung

Jeder extrazelluläre Stimulus erreicht über den cAMP Signalweg eine spezifische Zellantwort. Die Zelle erzeugt diese Vielzahl an Antworten durch nur einen second messenger, indem sie den cAMP-Konzentrationsanstieg auf einzelne Mikrodomänen beschränkt und damit eine begrenzte Anzahl an cAMP-Effektoren aktiviert, anstatt die cAMP-Konzentration gleichmäßig in der ganzen Zelle ansteigen zu lassen, was alle verfügbaren cAMP-Effektoren aktivieren würde. Somit entstehen in der Zelle viele cAMP-Konzentrationsgradienten [26] [27] [28] [29].

Mikrodomänen sind spezielle Kompartimente einer Zelle, in denen die Ausbreitung eines Moleküls begrenzt wird[30, 31]. Sie sind mit speziellen Bestandteilen der Zelle, wie Caveolen, der Zellmembran, Mitochondrien aber auch Rezeptoren oder Enzymen assoziiert.

Die Unterteilung der Zelle in funktionelle Mikrodomänen wird durch das Modell der Kompartimentierung beschrieben. Die Theorie der cyclic nucleotid Kompartimentierung wurde von vielen wissenschaftlichen Gruppen beobachtet und ist für eine Vielzahl von Zellen, second messengern und Rezeptoren gültig[26, 32-34].

Es gibt mehrere Mechanismen, welche die Kompartimentierung in Kardiomyozyten sicherstellen [35], [36]. Zum einen ist es die Trennung von Rezeptoren und deren Lokalisation an verschiedene Membran Microdomänen. Spezifische GPCR, AC, cAMP-pools, cAMP-Effektoren und PDEs bilden makromolekulare Komplexe an Caveolen, Lipid rafts und transversen Tubuli [37]. Des Weiteren vermitteln Struktur bildende Bindeproteine, AKAPS, ein Gerüst aus dem makromolekularen Komplex. Sie bringen cAMP Effektoren und PDEs in räumliche Nähe mit AC und limitieren die Ausbreitung des second messengers außerhalb der Mikrodomäne [38]. Physikalische Barrieren in Form von Mitochondrien oder endoplasmatischem Retikulum [39] und die Bindung von cAMP durch PKA und damit deren Pufferung [40] limitieren die Diffusion von second messengern[41]. Als letzter, essenzieller Regulationsmechanismus ist die Hydrolyse der second messenger durch PDEs zu nennen. Die Amplitude und Dauer des second messenger-Signals wird stark von der Aktivität von PDEs gesteuert[24, 26, 42]. Die Störung von auch nur einem dieser Mechanismen führt zur Auflösung von Mikrodomänen und pathologischen second messenger Signalwegaktivierungen und wird stark mit strukturellen Herzkrankheiten

assoziiert. Aufgrund der Kompartimentierung bestimmt die intrazelluläre Lokalisation der einzelnen Enzyme deren Einfluss auf den cAMP/cGMP Signalweg.

1.1.3 PDE-Lokalisation und Funktion

Phosphodiesterasen sind die einzigen Enzyme, die 3',5'-cyclische Nukleotide abbauen und sind die Hauptmechanismen, die zur Terminierung der second messenger Signalwege beitragen [24]. Deren Isozyme kommen in allen Gewebearten vor und spielen eine wichtige Rolle sowohl in der Aufrechterhaltung der Zellphysiologie als auch in pathologischen Prozessen im Herzen. Es wurden mehrere PDE-Inhibitoren als mögliche Ziele einer Behandlung von Herzkrankheiten getestet.

In Säugetieren sind 21 Gene bekannt, die fast 100 verschiedene PDE Isoformen kodieren[43-45]. Die Enzyme sind in Abhängigkeit von ihrer Primärstruktur, pharmakologischer Eigenschaft, kinetischer Aktivität, Substratspezifität und Aminosäuresequenz in 11 Familien unterteilt[24]. Die PDE-Familie wird mit einer arabischen Zahl (1-11) bezeichnet, ein Großbuchstabe steht für das Gen (A, B, C oder D) und eine arabische Zahl für die Spleißvariante (bsp. PDE3A1: Familie: 3, Gen A, Spleißvariante 1). Während PDE4, 7, 8 selektiv cAMP [44, 45] und PDE5, 6, 9 selektiv cGMP [46-48] hydrolysieren, kann eine dritte Kategorie von PDEs (PDE1, 2, 3, 10, 11) beide zyklischen Nukleotide hydrolysieren[49-51].

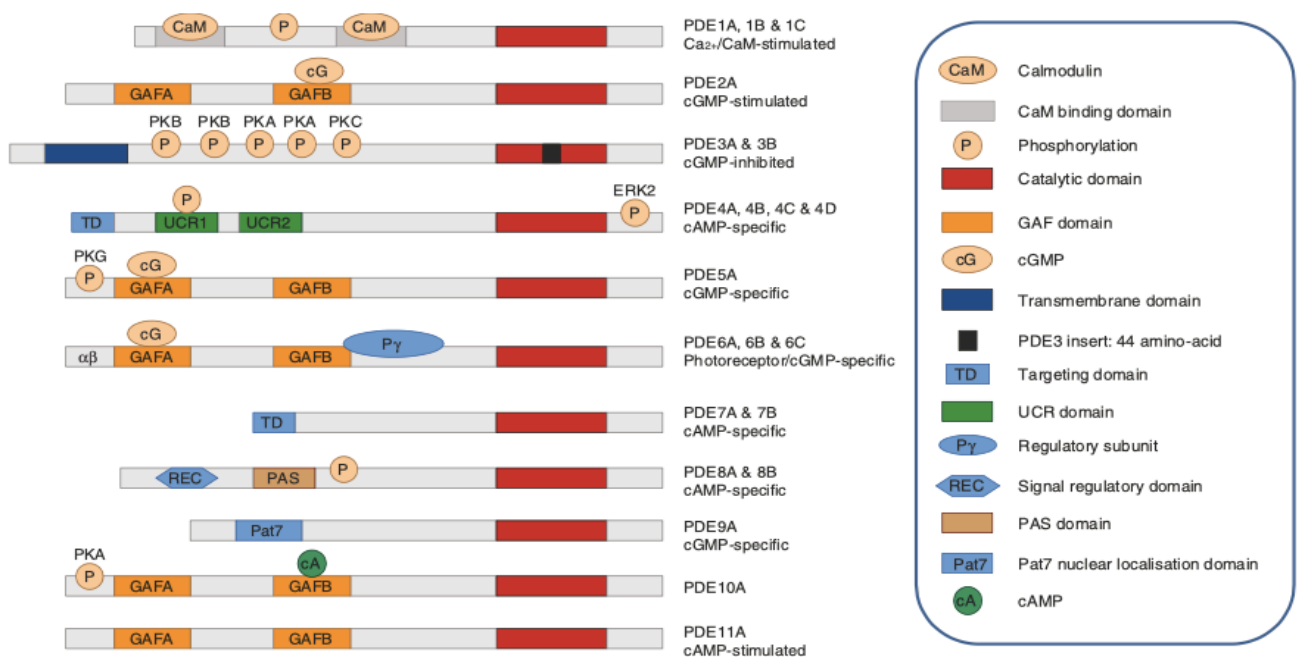


Abbildung 1: PDE-Familien

Die 11 PDE-Familien in Säugetieren. Die katalytischen Domänen sind rot gekennzeichnet. Die N-terminale Domänen, welche für die intrazelluläre Lokalisation, Interaktion von verschiedenen Signalmolekülen und Proteinen und Regulierung der PDE-Aktivität verantwortlich sind, sind mit verschiedenen Farben gekennzeichnet. (abgewandelt von ref. Maurice et al. 2014)

Alle PDEs besitzen eine katalytische Domäne (C-Domäne). Die Aminosäuresequenzen der einzelnen PDEs stimmen von 25% bis zu 52% miteinander überein. Die regulatorische N-Domäne hingegen stellt den Hauptunterschied dar. Sie bestimmt die subzelluläre Lokalisation und somit die Funktion von verschiedenen PDEs[52-54]. und ist für jede PDE-Familie charakteristisch. So enthält beispielsweise die PDE1-Familie eine Calmodulin-

Bindungsstellen (CaM), die zu einer Aktivierung des Enzyms durch Ca^{2+} führen. Außerdem enthält die N-Domäne mehrerer PDE-Familien eine GAF-Domäne, die die Dimerisierung des Enzyms und damit deren Regulierung durch zyklische Nukleotide bestimmt[55, 56]. Auch besitzen einige PDEs Phosphorylierungsstellen und werden somit durch Kinasen reguliert[57, 58]. Schließlich können N-Domänen mit AKAPs oder β -Arrestin assoziiert sein, welche die intrazelluläre Lokalisierung der Enzyme maßgeblich bestimmen[59]. Insbesondere die Erforschung der intrazellulären Lokalisation und die Assoziation mit spezifischen Signalosomen kann zu einem besseren Verständnis der Proteinfunktion führen.

1.1.4 cAMP- und cGMP-crosstalk im Herzen

Im Herzen beeinflussen sich der cAMP- und cGMP-Signalweg gegenseitig. Der cAMP-Signalweg stimuliert Inotropie, Chronotropie und Lusitropie, wobei der cGMP-Signalweg eine antagonistische Wirkung hat. Der second messenger crosstalk bewirkt ein Gleichgewicht der second messenger Signalwege, welches für die Aufrechterhaltung der Herzphysiologie essenziell ist. PDEs spielen bei diesem Mechanismus eine wichtige Rolle, da beispielsweise der crosstalk zwischen dem β -adrenergen und dem NO/cGMP/PKG-Signalweg durch die unterschiedliche Selektivität für cyclische Nucleotide, welche für jedes PDE spezifisch ist, vermittelt wird.

1.1.5 PDE2A

PDE2A erfüllt eine einzigartige Rolle im Second Messenger Crosstalk, da es als einzige PDE von cGMP aktiviert wird und beide zyklischen Nukleotide hydrolysiert. Aus diesem Grund wird PDE2A auch als "cGMP-aktivierte PDE" bezeichnet.

Molekulare Aspekte

PDE2A wird durch das *PDE2A-Gen* kodiert. Durch alternatives Spleißen wird das PDE2A-Gen in drei verschiedene mRNAs transkribiert, die in drei Isoformen translatiert werden: PDE2A1[59], PDE2A2[60], PDE2A3[61]. Alle Isoformen besitzen die gleiche Domänenstruktur mit einer N-terminalen, GAF-A, GAF-B und katalytischen Domäne, wobei die N-terminale Domäne, die meisten Unterschiede aufweist und die Lokalisation des Enzyms in der Zelle bestimmt. PDE2A1 ist zytosolisch, PDE2A2 mitochondrial und PDE2A3 mit dem Zellkern, dem Golgi-Apparat, der Plasmamembran und dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert[53, 62]. Es ist unklar, ob die zytosolische oder die membrangebundene Fraktion dominiert und die Literatur deutet darauf hin, dass die intrazelluläre Verteilung von Spezies zu Spezies unterschiedlich ist[63].

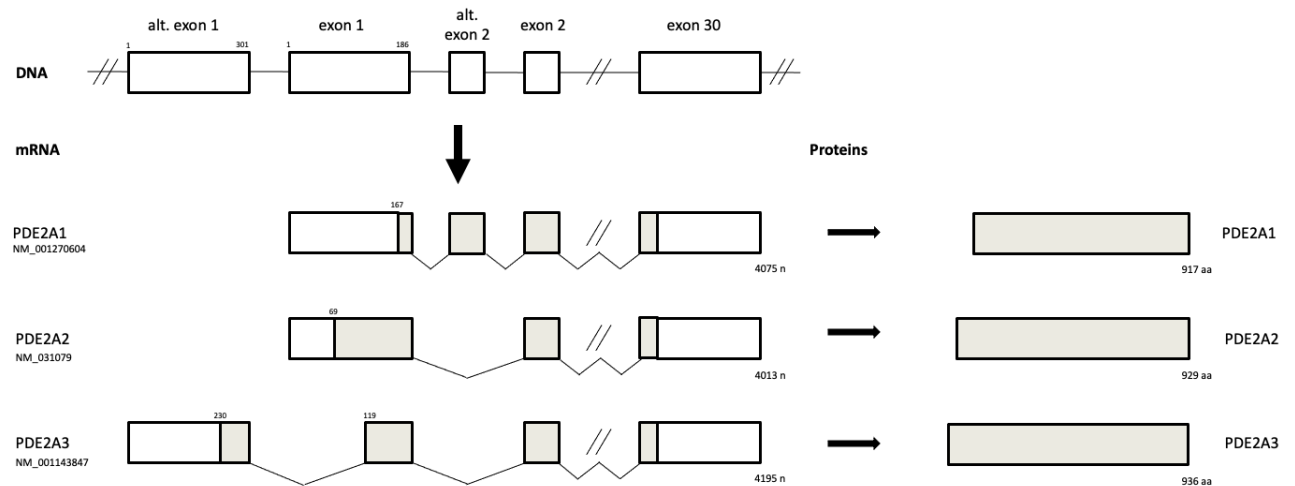


Abbildung 2: PDE2A Isoformen

PDE2A-Isoformen in Ratten-KM. Das PDE2A-Gen besteht aus 30 Exons und 2 alternativen Exons. Ein großer schwarzer Pfeil verdeutlicht die Transkription in 3 verschiedene mRNAs: PDE2A1, PDE2A2, PDE2A3. Sie entstehen durch alternatives Spleißen. Die weißen Balken verdeutlichen das ORF und die grau gefüllten Balken die translatierte Region. PDE2A1 wird mit einem zusätzlichen alternativen Exon transkribiert (alt. Exon 2). PDE2A2 hat keine alternativen Exons. PDE2A3 wird mit einem zusätzlichen alternativen Exon transkribiert (alt. Exon 1). 3 kleinere Pfeile verdeutlichen die Translation in 3 verschiedene Isoformen. Die Länge der mRNA und die Größe der Proteine sind in der unteren rechten Ecke angegeben (n - Nukleotide; aa - Aminosäuren)

Die GAF-A-Domäne ermöglicht die Dimerisierung des Enzyms und die GAF-B-Domäne besitzt ein cGMP bindendes Motiv. Die Bindung von cGMP an der GAF-B Domäne erhöht die cAMP-Hydrolyserate, jedoch kommt es bei hohen cAMP Konzentrationen zu keiner allosterischen Stimulation [53, 54]. PDE2A hydrolysiert sowohl cAMP als auch cGMP. Jedoch ist der K_m -Wert für die Hydrolyse von cGMP ($10\mu\text{M}$) geringer als der K_m -Wert für die Hydrolyse von cAMP ($30\mu\text{M}$) [64, 65].

PDE2A wird in Makrophagen, T-Lymphozyten [66], Blutplättchen [67], Fibroblasten [68], Endothelzellen [69] und Kardiomyozyten exprimiert. Neben cAMP und cGMP wird die Expression und Aktivität von PDE2A auch durch Zytokine, Katecholamine und Prostaglandine reguliert [70]. Unter normalen Bedingungen ist PDE3 das wichtigste cAMP hydrolysierende Enzym, und die PDE2A-Expression im Herzen ist relativ gering. Unter pathophysiologischen Bedingungen hingegen steigt die PDE2A-Expression drastisch an.

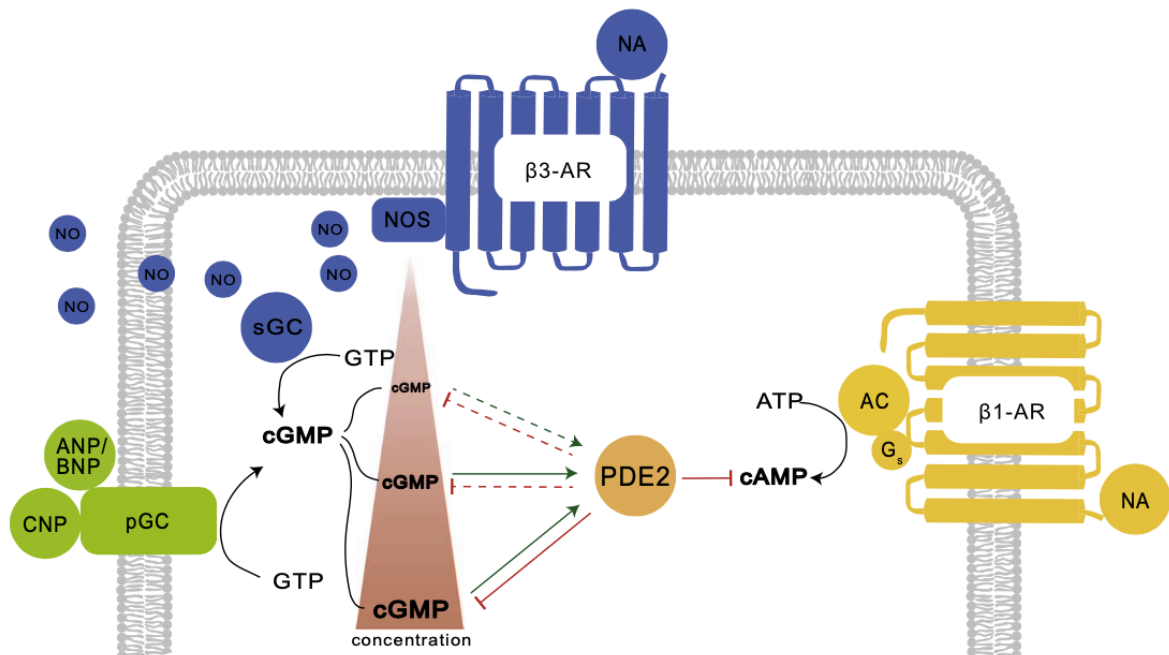


Abbildung 3: Funktion von PDE2

PDE2A kann durch cGMP stimuliert werden, wodurch deren Hydrolyserate von cAMP ansteigt. In Kardiomyozyten kann cGMP sowohl durch die partikuläre Guanylylzyklase (pGC), die durch natriuretische Peptide (ANP, BNP und CNP) stimuliert wird, als auch durch die NO-abhängige lösliche Guanylylzyklase (sGC) synthetisiert werden. NO kann hingegen außerhalb (durch Endothelzellen) als auch innerhalb der Zelle (durch die β 3-Adrenorezeptor (β 3-AR) stimulierte NO-Synthase) synthetisiert werden. PDE2A hydrolysiert cAMP z. B. als Reaktion auf die Stimulation der Adenylatcyclase (AC) durch den β -adrenergen Agonisten Noradrenalin (NA) (Weber et al. 2017)

Funktion von PDE2A

Es wird angenommen, dass die PDE2A-abhängige cAMP-Hydrolyse unter Hochregulierung des β -Adrenorezeptors eine kritischere Rolle spielt [48, 71, 72].

Jedoch sind die Erkenntnisse über die Art der cGMP-gesteuerten cAMP-Hydrolyse durch PDE2A nicht eindeutig. In einer Studie konnte PDE2A unter basalen Bedingungen den durch Forskolin vermittelten Anstieg von cAMP nicht wirksam aufheben[71]. In einer anderen Studie konnte PDE2A dem intrazellulären Anstieg von cAMP nach katecholaminerger Stimulation der β -Adrenorezeptoren unter gleichzeitiger Stimulation mit ANP entgegenwirken[73-76]. Aus diesen Ergebnissen schließen wir, dass die PDE2A-vermittelten cAMP-Hydrolyse durch die Aktivierung des NP/pGC-Wegs erfolgt und die PDE2A Funktion von Kompartiment zu Kompartiment, in dem es exprimiert wird, unterschiedlich ist[71]. Weitere In-vitro-Experimente deuten darauf hin, dass ein anderes PDE2A-Kompartiment die Hypertrophie steuert, indem es die PKA-abhängige Phosphorylierung von NFAT reguliert[77].

cGMP inhibiertes PDE3, cGMP stimuliertes PDE2A und PKG spielen alle eine wichtige Rolle in der Regulierung des cAMP/PKA-abhängigen Ca^{2+} -Strom in L-Typ Kanälen in Herzschrattmacherzellen. cGMP kann Ca^{2+} -Strom und Kontraktilität sowohl stimulieren als auch inhibieren, was durch die unterschiedliche Affinität dieser drei Effektoren für cGMP erklärt wird.

Bei niedriger cGMP-Konzentration, überwiegt die hemmende Wirkung von PDE3, der Ca^{2+} -Strom und die Kontraktilität nehmen zu. Nimmt die cGMP-Konzentration zu, überwiegt der Effekt der Aktivierung von PDE2A und PKG, der Ca^{2+} -Strom und die Kontraktilität nehmen ab. Dieser Effekt wurde in vielen Studien und verschiedenen Tierarten nachgewiesen[72, 78]. Dennoch gibt es nur wenige Erkenntnisse über die in vivo Funktion von PDE2A, was darauf zurückzuführen ist, dass es nicht möglich war mit

konventionellen Methoden Tiermodelle zu erzeugen. Ein vollständiger PDE2A-Knockout führt zum Tod des Embryos. Während der Embryonalentwicklung hatten K.O.-Tiere Nackenödeme, vergrößerte Herzen und Myokardwanddefekte. Auf molekularer Ebene wurden in Kardiomyozyten vermehrt Apoptosen und eine verringerte Expression von entwicklungsfördernder T-Box-Genen beobachtet. Diese Befunde deuten darauf hin, dass PDE2A während der Embryonalentwicklung eine wesentliche Rolle spielt[79, 80].

Unter pathologischen Bedingungen wie der Herzinsuffizienz oder Herzrhythmusstörungen ändert sich die Lokalisierung und die Expression von PDE2A steigt drastisch an. Myokardzellen des linken Ventrikels von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie wiesen eine stark erhöhte Expression von PDE2A auf[73]. Versuche an Hamstermodellen mit induzierter Kardiomyopathie, sowie an Hundemodellen mit Herzinsuffizienz und Ratten- und Mausmodellen mit Myokardinfarkten wiesen ebenfalls eine veränderte PDE2A-Expression und Aktivität auf. Veränderte PDE2A-Expressionsmuster wurden auch in anderen kardiovaskulären Pathologien detektiert wie der Atherosklerose, Sepsis[81-83], Thrombose [84] und bei Entzündungsreaktionen[42]. Es bleibt ungeklärt, ob die Überexpression und veränderte Lokalisation von PDE2 bei Herzerkrankungen eine mögliche Ursache dieser ist, die zum Fortschreiten der Erkrankungen führt und ihren Ausgang bestimmt oder ob lediglich eine Korrelation zwischen dem Fortschreiten der Pathologien und den veränderten Expressions- und Lokalisationsmustern besteht. Oder handelt es sich vielleicht um eine adaptive Reaktion des Herzens, die dem pathologischen Umbau der Kardiomyozyten entgegenwirkt?

1.1.6 PDE3A

PDE3 wird auch als „cGMP-inhibiertes PDE“ bezeichnet[85]. Es hydrolysiert cGMP und cAMP und ist die wichtigste cAMP-hydrolysierende PDE in gesunden KM unter basalen Bedingungen[86].

Molekulare Aspekte

PDE3 wird durch die Gene *PDE3A* und *PDE3B* kodiert[87, 88]. *PDE3A* wird in 2 mRNAs transkribiert, die in 3 Isoformen translatiert werden: PDE3A1, PDE3A2 und PDE3A3[89]. Die PDE3A-Isoformen unterscheiden sich in der Länge der N-terminalen Sequenz[89].

PDE3A1 ist die längste aller Isoformen. Sie enthält in ihrer N-terminalen Sequenz NHR1 und NHR2, hydrophobe Schleifen, die die Lokalisation des Enzyms in der Zelle bestimmen[90, 91] und mehrere Phosphorylierungsstellen für PKA, PKB und PKC aufweisen[92-94]. PDE3A2 fehlt NHR1 sowie die Phosphorylierungsstellen für PKB und PKC. Folglich fehlen bei PDE3A3 alle hydrophoben Schleifen und Phosphorylierungsstellen. Alle PDE3A-Isoformen sind hauptsächlich im sarkoplasmatischen Retikulum und in der Kernhülle des Herzens in der Nähe von „nucleopore“ Komplexen lokalisiert [95]. Dabei ist PDE3A1 vor allem mit Lipidmembranen assoziiert, während PDE3A2 und PDE3A3 in subzellulären Präparationen von Kardiomyozyten sowohl in mikrosomalen als auch in zytosolischen Fraktionen detektiert wurden [89].

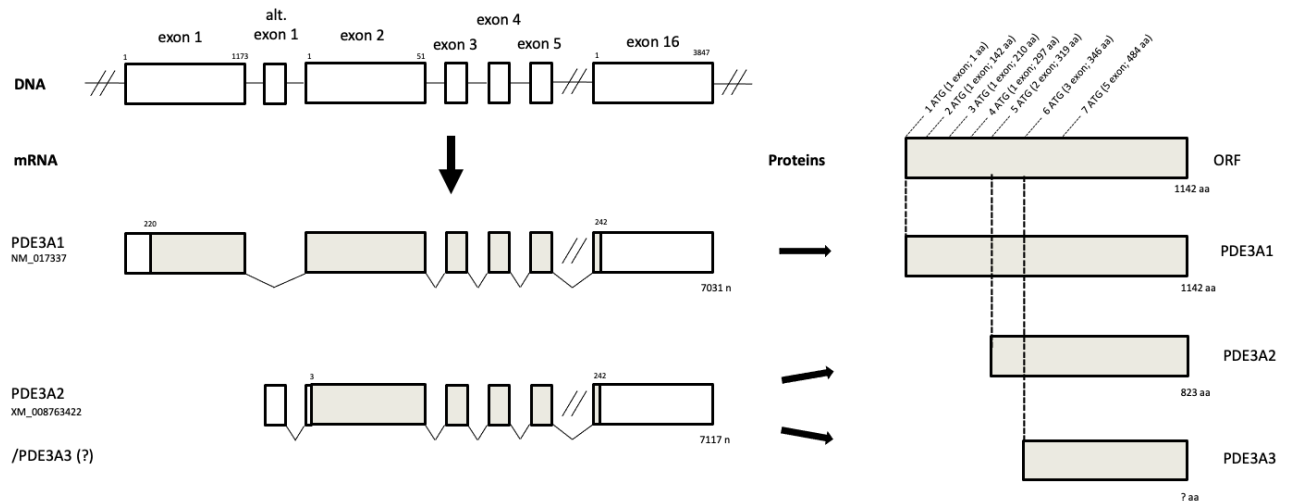


Abbildung 4: PDE3A Isoformen

PDE3A-Isoformen in Ratten-Kardiomyozyten. Das PDE3A-Gen besteht aus 16 Exons und 1 alternativen Exon. Ein großer schwarzer Pfeil verdeutlicht die Transkription in 2 verschiedene mRNAs: PDE3A1 und PDE3A2/PDE3A3. Sie entstehen durch alternatives Spleißen. PDE3A1 hat keine alternativen Exons. PDE3A2/PDE3A3 hat ein alternatives Exon (alt. Exon 1). Außerdem beginnt die Transkription an einer weiter stromabwärts gelegenen Kozak-Konsensussequenz. 3 kleinere Pfeile verdeutlichen die Translation in 3 verschiedene Isoformen. Die mRNA PDE3A1 wird in die Isoform PDE3A1 translatiert, während die mRNA PDE3A2/PDE3A3 in 2 verschiedene Isoformen translatiert wird, die sich nur in ihrer Länge unterscheiden: PDE3A2 und PDE3A3. Weitere ATG-Sequenzen weisen auf mögliche alternative Translationsstellen hin, was auf eine größere Anzahl von PDE3A-Isoformen hindeutet. Die Länge der mRNAs und die Größe der Proteine sind in der unteren rechten Ecke angegeben (n - Nukleotide; aa - Aminosäuren)

Phosphorylierung von PDE3A1 durch PDKA, PKB und PKC und von PDE3A2 durch PKA stimuliert ihre katalytische Aktivität und dient gleichzeitig als negativer Rückkopplungsmechanismus bei der cAMP-Signalübertragung. Alle PDE3 Isoformen weisen die gleiche katalytische Aktivität und Empfindlichkeit zu spezifischen PDE3 Inhibitoren auf[96]. Die Hydrolyserate V_{max} von PDE3A für cAMP ist fast 10-mal höher als deren Hydrolyserate für cGMP. Demzufolge wirkt cGMP als kompetitiver Inhibitor für die cAMP-Hydrolyse. PDE3A hat eine hohe Affinität für cGMP ($K_M = 0,02 \mu M$) und ist die wichtigste PDE, bei niedrigen cGMP-Konzentrationen unter basalen Bedingungen, die zum Abbau von cGMP beiträgt[97]. PDE3A wird hauptsächlich im Herzen, in glatten Muskelzellen, Oozyten und Thrombozyten exprimiert. Das Gen *PDE3B* kodiert die Isoform PDE3B1, welches hauptsächlich in Adipozyten, Hepatozyten, β -Zellen des Pankreas und Spermatozyten exprimiert wird[98, 99].

Funktion von PDE3A

PDE3A1 ist in einer Mikrodomäne mit dem sarkoplasmatischen Retikulum lokalisiert, wo es cAMP hydrolysiert, und ist somit ein wichtiger Faktor in der Regulierung der Inotropie des Herzens. Zusammen mit PKA, SERCA2, Phospholamban (PLN) und Desmin interagiert es mit dem Ankerprotein AKAP18 [100-102]. Bei niedriger cAMP-Konzentration ist PKA inaktiv. PLN ist nicht phosphoryliert, inhibiert SERCA2 und hindert somit die Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum. Sobald die β -Adrenorezeptoren stimuliert werden steigt die cAMP-Konzentration in dieser Mikrodomäne an und PKA phosphoryliert PLN. Es entfällt die hemmende Wirkung von PLN auf SERCA2 und Ca^{2+} wird in das sarkoplasmatische Retikulum aufgenommen[102]. Somit hat der Anstieg von cAMP einen positiven inotropen Effekt. Im Zuge des Mechanismus der negativen Rückkopplung wird die hydrolytische Aktivität von PDE3A1 stimuliert, cAMP wird hydrolysiert und die Inotropie nimmt ab. Dieser durch die PDE3A1 Aktivität vermittelte negativ inotrope Effekt wurde in mehreren Versuchen repliziert. Wie erwartet kam es zu

einem positiv inotropen Effekt bei selektiver Inhibition von PDE3A1 [101] und zu einem negativ inotropen Effekt Überexpression von PDE3A1[103]. Einige Studien deuten darauf hin, dass PDE3A1 nicht nur SERCA2 moduliert, sondern auch direkt mit PKA interagiert und somit alle nachgeschalteten Ziele der PKA-Phosphorylierung reguliert [102]. Diese Effekte breiten sich nicht auf die Isoformen PDE3A2 und PDE3A3 aus, da diesen PDEs die N-terminale Domäne für die Protein-Protein Interaktion mit AKAP18 fehlt [92]. Es gibt weitere Unterschiede in den Protein-Protein Interaktionen oder Phosphorylierungsstellen, die sich Wissenschaftler zunutze machen können, um die spezifischen Funktionen von den PDE3A-Isoformen zu untersuchen[104-106].

PDE3A ist in einem weiteren Komplex mit PI3Ky, dem β 2-Adrenorezeptor und PDE4 assoziiert[107]. Unter physiologischen Bedingungen erhöht die Aktivierung dieses β 2-Adrenorezeptor-Komplexes die lokale cAMP-Konzentration und aktiviert PKA zusammen mit dem PI3Ky-Signalweg. PKA phosphoryliert wiederum PDE3[108], welches die Diffusion von cAMP auf die lokale Mikrodomäne begrenzt. Unter pathologischen Bedingungen verliert PI3Ky ihre Gerüstfunktion. cAMP entweicht unter anderem in die benachbarte Mikrodomäne des sarkoplasmatischen Retikulums. Dies führt zu einer pathologischen PKA-vermittelten Phosphorylierung von PLN und Ca^{2+} -Kanälen[108, 109] und ist stark mit kontraktile Dysfunktion sowie einer erhöhten Sterblichkeit infolge chronischer ventrikulärer Tachykardien assoziiert.

Des Weiteren weist PDE3A einen anti-apoptotischen Effekt auf. Bei verminderter Expression von PDE3A kommt es zur Phosphorylierung des „cAMP response element binding protein“ (CREB) und zur Expression von „inducible cAMP early repressors“ (ICER). Dieser Mechanismus ist eine positive Rückkopplungsschleife, welcher die Expression von PDE3A weiter vermindert und zur Apoptose des KM führt[110, 111]. Umgekehrt hat die Überexpression von PDE3A einen anti-apoptotischen Effekt, indem es die ICER Expression reduziert[103].

Es gibt Hinweise auf eine durch PDE3A vermittelte antihypertrophen Effekt. Patienten mit einer seltenen Missense Mutation in der katalytischen Domäne von PDE3A, welche deren katalytische Aktivität stark erhöht, präsentieren sich mit dem Phänotyp eines starken Bluthochdrucks und einer Bradykardie. Entgegen den Erwartungen zeigen die Patienten nur eine leichte Herzhypertrophie, was für eine durch PDE3A vermittelte antihypertrophe Wirkung spricht [112-114].

Das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz ist durch die Abnahme der kardialen Inotropie, den pathologischen Umbau der Kardiomyozyten und Verringerung der β -Adrenorezeptordichte gekennzeichnet[115]. In klinischen Studien wurden Patienten mit diesem Krankheitsbild PDE3-Inhibitoren verabreicht, um den Krankheitsverlauf zu verbessern und Inotropie ansteigen zu lassen. Die Studie ergab, dass durch die chronische Einnahme von PDE3-Inhibitoren die Mortalität der Patienten durch plötzlichen Herztod ansteigt [116] und es wurde vermutet, dass die erhöhte Mortalität der arrhythmogenen, prohypertrophen und pro apoptotischen Effekten der PDE3-Inhibitor zu zuschulden ist [43, 117].

1.2 CRISPR/Cas9, eine präzise Technik für Genom-Editierung

Das gezielte Knockdown von Genen durch RNS-Interferenz (RNSi) ist eine etablierte Methode zur Untersuchung von Genfunktion und bietet Forschern eine schnelle und kostengünstige Alternative zur homologen Rekombination[118]. Jedoch führt die Methode zu keiner vollständigen Inaktivierung des Gens, bewirkt nur eine

Cas9 Effektornuklease und führt zur Spaltung der zu ihr komplementären Nukleinsäuren, wenn eine PAM-Sequenz vorhanden ist[147].

Am Typ II CRISPR-Cas-System wurden zahlreiche Modifikationen vorgenommen, um deren Effektivität als Werkzeug für Genom-Editierung zu verbessern. Zum einen wurde die crRNS und tracrRNS zu einer einzigen chimären guide RNS (gRNS) fusioniert, was die Anwendung des CRISPR/Cas9 Systems vereinfacht[137]. An der Cas9 Nuklease wurden Codon Optimierungen vorgenommen, um deren Effektivität in eukaryotischen Organismen zu steigern. Sie wurde uns von der „core facility transgenic animal and genetic engineering models“ TRAM der Medizinischen Fakultät Münster bereitgestellt. Dennoch bestehen Probleme in der Anwendung des CRISPR/Cas9 Systems wie mögliche off-targets, die bewältigt werden müssen.

1.3 FRET, eine Methode zur Messung von cAMP in lebenden Zellen

Für die Messung des cAMP-Gehaltes in lebenden Zellen können traditionelle biochemische Techniken wie Immunoblots, Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA), oder Radioimmunoassays (RIA) verwendet werden [148, 149]. Diese Methoden sind sensitiv und spezifisch und erlauben die Quantifizierung des gesamten cAMP-Gehaltes nach Lyse der Zellen oder Gewebe, jedoch bieten sie keine räumliche und zeitliche Auflösung der second messenger Konzentrationen. Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ist eine neue, bahnbrechende Methode, die die Echtzeitmessung von cAMP-Konzentrationen in verschiedenen subzellulären Mikrodomänen in intakten lebenden Zellen ermöglicht [28, 149]. Sie beruht auf einem nicht-radioaktiven, distanzabhängigen Energieaustausch eines Donor und eines Akzeptorfluorophores [150] und wurde 1948 erstmals vom deutschen Physiker Theodor Förster beschrieben [151]. Damit FRET stattfinden kann, darf die Distanz zwischen dem Donor- und Akzeptorfluorophor nicht größer als 10 nm (Förster-Radius) betragen. Des Weiteren müssen die Absorptions-Emissionsspektren des Fluorophor Paares zu mindestens 30% überlappen [150, 152] (Abbildung 7). Die zugrundeliegenden physikalischen Prinzipien sind im Jablonski-Diagramm dargestellt (Abbildung 7). Die Absorption eines Photons durch ein Elektron des Donorfluorophors befördert dieses aus einem „singlet ground state“, S_0 , auf ein höheres Energieniveau, S_1 . Sobald das Elektron wieder auf S_0 herabfällt, emittiert es ein für das Donor-Fluorophor charakteristisches Photon (Fluoreszenz), welches durch ein nahe gelegenes Akzeptorfluorophor absorbiert werden kann. Dadurch wird wiederum ein Elektron des Akzeptorfluorophores auf ein höheres Energieniveau befördert. Es emittiert ein für das Akzeptorfluorophor charakteristisches Photon, sobald das Elektron wieder auf S_0 absinkt[153]. Die Wahrscheinlichkeit der Absorption eines Photons durch den Akzeptor Fluorophor ist umgekehrt proportional zur Distanz beider Fluorophore zueinander. Somit kann die Effizienz von FRET in der folgenden Gleichung beschrieben werden.

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$$

Abbildung 6: Gleichung zur Ermittlung der Effizienz von FRET

Mit zunehmender Distanz (r) der Fluorophore zueinander nimmt die Effizienz (E) von FRET ab. R_0 ist der Förster-Radius und beschreibt die Distanz, bei welcher die Hälfte der Energie übertragen wurde.

Die erste FRET-Sonde für cAMP basierte auf PKA [29, 154]. Dabei wurden zwei Fluorophore mit der regulatorischen und katalytischen Untereinheit des Enzyms fusioniert. Wenn PKA als Holoenzym vorliegt ist die Distanz zwischen beiden Fluorophoren gering und FRET findet statt. Sobald die cAMP-Konzentration ansteigt, führt die Bindung des second messengers an die regulatorische Untereinheit zur Dissoziation des Komplexes und das FRET-Signal nimmt ab. Seitdem wurden eine Vielzahl von FRET-Biosensoren entwickelt von denen viele von dem „Exchange factor directly activated by cAMP“ (Epac) abgeleitet sind [155-157]. Die adenovirale Transfektion ist eine zuverlässige Methode zur Vermittlung der Expression dieser Biosensoren in primären KM [158-161].

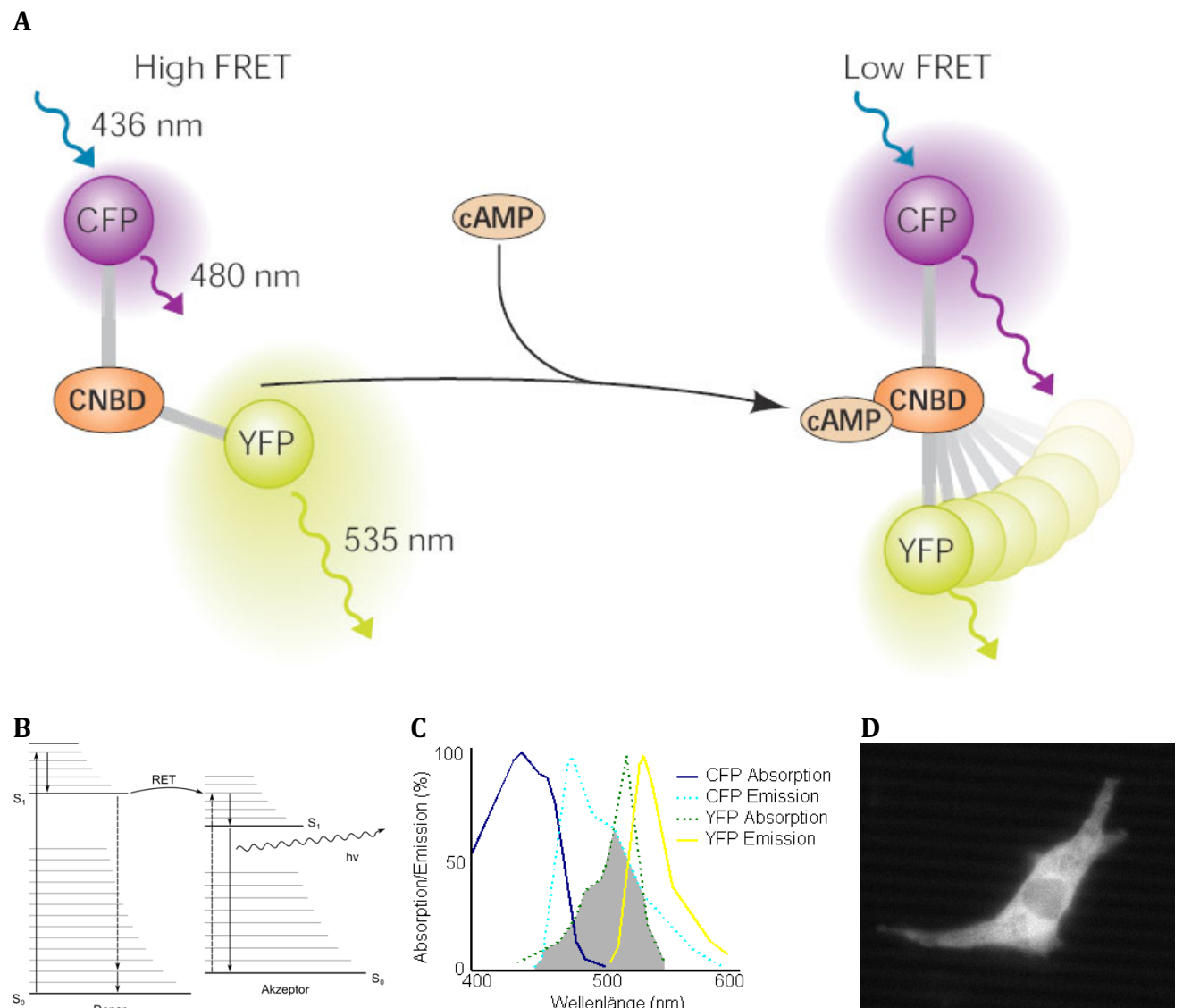


Abbildung 7: Prinzip des FRET

A. Der auf Epac basierte cAMP-Sensor (camps) ist aus einer „single nucleotide binding domain“ (CNBD) und zwei Fluorophoren (CFP, YFP) zusammengesetzt. Aufgrund der Bindung von cAMP ändert das Enzym seine Form, die Distanz zwischen den Fluorophoren nimmt zu und FRET nimmt ab. **B.** Ein Jablonski Diagramm, welches die Funktionsweise von FRET erklärt. Die Absorption eines Photons befördert ein Elektron des Donors von S_0 auf S_1 . Beim Abfall auf S_0 wird ein Photon emittiert, welches ein Akzeptor-Elektron von S_0 auf S_1 befördern kann (FRET). **C.** Überlappung des Donor und Akzeptor Emissionsspektrums. (Nikolaev VO, Lohse MJ. Physiology 2006). **D.** Beispiel eines neonatalen KM bei der FRET-Messung

1.4 Zielsetzung der Arbeit

1.4.1 Etablierung einer auf CRISPR/Cas9 basierten Methode zur Knockoutierung spezifischer Isoformen in primären Zellen

Die Genom-Editierung dient heute als "Goldstandard" für die Bestimmung von Genfunktionen. Doch nehmen konventionelle Methoden viel Zeit in Anspruch und für die Generierung transgener Tierlinien müssen eine Vielzahl von Lebewesen verwendet werden. Mit der Entdeckung von CRISPR bietet sich neuerdings die Möglichkeit an KO in primären Zellen vorzunehmen.

Wir beabsichtigen einen spezifischen PDE2A und PDE3A KO durch die Einbringung der CRISPR/Cas9 Nuklease mittels adenoviraler Vektoren in primäre adulte und neonatale KM. Die Nuklease würde einen Doppelstrangbruch in der chromosomalen DNS bewirken, welcher von der Zelle durch den HDR-Mechanismus repariert werden würde. Die neu generierte mRNS würde durch den „nonsense mediated RNA decay“ abgebaut werden. Somit ist das Ziel dieser Arbeit die Etablierung einer neuen Methode zur schnelleren, kostengünstigeren und weniger tierintensiven Methode zur Erstellung von spezifischen KO. Es besteht auch die Perspektive KO von humanen Zellen zu erstellen und somit Erkenntnisse von Tierexperimenten unmittelbar auf den Menschen zu übertragen.

1.4.2 Untersuchung der Funktion von PDE2A und PDE3A Isoformen in adulten und neonatalen Kardiomyozyten

PDE2A und PDE3A spielen zusammen mit anderen PDE-Familien eine zentrale Rolle bei der cAMP-Kompartimentalisierung, welche für die KM ein wichtiges Paradigma darstellen. Darüber hinaus sind diese PDEs entscheidend für die cGMP/cAMP-Interaktion, die bekanntermaßen die Herzfunktion und -erkrankungen reguliert. Trotz der Bedeutung beider PDE-Familien war es schwierig die Rolle einzelner Isoformen zu untersuchen, da es bis jetzt nicht möglich war mit chemischen Stoffen PDE-Isoformen spezifisch zu inhibieren. Inhibitoren weisen nur einen geringen Unterschied in der Affinität zu einzelnen Isoformen derselben PDE-Unterfamilie auf. Andere Ansätze die Funktion der Isoformen zu untersuchen beruhte auf RNSi-Methode oder der Überexpression katalytisch inaktiver Isoformen, welche als kompetitive Inhibitoren die endogenen Isoformen von ihren subzellulären Standorten verdrängen. Dennoch sind die Funktionen spezifischer Isoformen weiterhin unbekannt, zum Teil, weil es Mittels konventioneller Verfahren zur Gen-Editierung nicht möglich war, spezifische Isoform-KO zu erzeugen. Durch die spezifische Inhibition bestimmter Isoformen ohne die gleichzeitige Beeinflussung der anderen, könnten ungewollte Nebenwirkungen der PDE-Inhibitor-Therapie vermieden werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Tierhaltung

Rattenlinien: Alle Ratten für die Organentnahmen wurden aus dem Tierstall des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (UKE) beschaffen. Die Tiere wurden in 12h Tag und 12h Nachtzyklen gehalten. Alle Experimente wurden im Einklang mit den Richtlinien durchgeführt.

Die in dieser Arbeit wurden Wistar Ratten von der Firma Janvier verwendet.

Tabelle 1: Rattenlinien

Rattenlinie
Wildtyp

2.1.2 Eukaryotische Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zelllinien sind in Tabelle 2 verzeichnet

Tabelle 2: eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Hersteller	Katalognummer
HEK293A	Invitrogen	R705-07

2.1.3 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 3 verzeichnet

Tabelle 3: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Hersteller	Katalognummer
XL1-Blue MRF ⁺	Agilent Technologies	200230

2.1.4 Zellkultur

In der Zellkultur verwendete Chemikalien sind in der Tabelle 4 verzeichnet

Tabelle 4: Zellkultur

Chemikalien	Hersteller	Katalognummer
DMEM, 4.5 % Glukose	Biochrom	F0445
FCS	Biochrom	S0615
Glutamine	Merck	K0282
PBS Phosphate Buffered Saline (Dulbecco)	Biochrom	L1825
Penicillin/Streptomycin	Biochrom	A2213
Plaque GP Agarose	A2213 Biozym	850110

Trypsin/EDTA solution	Biochrom	L2143
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma Aldrich	A6003-25G
Laminin	Sigma Aldrich	L2020
Lipofectamine 2000	Invitrogen	11668-027

2.1.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics synthetisiert und für die Klonierung von gRNS expressierenden Plasmiden und als Primer für PCR, RT-PCR, qPCR verwendet. Die klebrigen Enden der DNS-Doppelstränge nach der Hybridisierung der zueinander komplementären Oligonukleotide sind in blau gekennzeichnet (**CACC**, **AAAC**). Das erste Nukleotid der gRNS target Sequenzen ist in Rot gekennzeichnet (**G**) und ist in den meisten Fällen ein Guanidin.

Tabelle 5: Oligonukleotide

Oligonukleotide	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
PDE2AgRNA13_1d	CACC G AGTCGAGCCACTGACCAGG	gRNS
PDE2AgRNA13_1r	AAAC CCCTGGTCAGTGGCTCGACTG	gRNS
PDE2AgRNA8_1d	CACC G TTGCAGGATCTTTCGGTCA	gRNS
PDE2AgRNA8_1r	AAAC TGACCGAAAGATCCTGCAAC	gRNS
PDE2AgRNA8_3d	CACC G GCTCTGGTGGCCCTGCAGA	gRNS
PDE2AgRNA8_3r	AAAC TCTGCAGGGCCACCAGAGCC	gRNS
PDE3AgRNA12_1d	CACC G GGTTTACACACGGACACAT	gRNS
PDE3AgRNA12_1r	AAAC ATGTGTCCGTGTGTAAACCC	gRNS
PDE3AgRNA12_2d	CACC G GGCTGGAATATTTCCAGAC	gRNS
PDE3AgRNA12_2r	AAAC GTCTGGAAATATTTCCAGCCC	gRNS
PDE2AgRNA12_1d	CACC G AGTAGAGACGACCGACTGG	gRNS
PDE2AgRNA12_1r	AAAC CCAGTCGGTTCGTCTCTACTC	gRNS
PDE2AgRNA12_2d	CACC G GGAGTAGAGACGACCGAC	gRNS
PDE2AgRNA12_2r	AAAC GTCCGGTCGTCTCTACTCCC	gRNS
PDE2AgRNA21_1d	CACC G AGGATGTGGTGCAACACC	gRNS
PDE2AgRNA21_1r	AAAC GGTGTTGCACCACATCCTC	gRNS
PDE2AgRNA21_2d	CACC G GAATTGGACAACAGCGATG	gRNS
PDE2AgRNA21_2r	AAAC CATCGCTGTTGTCCAATTCC	gRNS
PDE2AgRNA31_1d	CACC G CTAGTACTCACGGCTCAGC	gRNS
PDE2AgRNA31_1r	AAAC GCTGAGCCGTGAGTACTAGC	gRNS
PDE2AgRNA31_3d	CACC G CGGCCACTCCATCCTCTGC	gRNS
PDE2AgRNA31_3r	AAAC GCAGAGGATGGAGTGGCCGC	gRNS
PDE3AgRNA1_1d	CACC G ACTAGCGCCCTCAGGACGG	gRNS
PDE3AgRNA1_1r	AAAC CCGTCCTGAGGGCGCTAGTC	gRNS
PDE3AgRNA1_2d	CACC G TCGCCTGGAGACCTTACC	gRNS
PDE3AgRNA1_2r	AAAC GGTAAGGTCTCCAGGCGACC	gRNS
PDE3AgRNA_A1_1d	CACC G AGGCTGGCTTTGTCAGGTG	gRNS
PDE3AgRNA_A1_1r	AAAC CACCTGACAAAGCCAGCCTC	gRNS
PDE3AgRNA_A1_2d	CACC A GGCTGGCTTTGTCAGGTGA	gRNS
PDE3AgRNA_A1_2r	AAAC TCACCTGACAAAGCCAGCCT	gRNS
Pde3a1for	GTTTGGGTCCCAGTCGAGC	PCR
Pde3a1rev	GGGATCCTCGTGACCCTCTC	PCR

Pde3a2for	GGTTTGGGTCCCAGTCGAG	PCR
Pde3a2rev	TCGTGACCCTCTCTTGTTGGT	PCR
PDE2a1for	GTTGTCCAATTCCTCAGGCGG	PCR
PDE2a1rev	ACAGTCTCCACTTTGGGGAGC	PCR
PDE2a2for	TTGTCCAATTCCTCAGGCGGG	PCR
PDE2a2rev	CAGTCTCCACTTTGGGGAGCA	PCR
PDE2A_totD1	CCTGCAGGTGGTGGAGAA	PCR
PDE2A_totD2	GGCCAGCTGAGTGACAGTG	PCR
PDE2A_totR1	GGATCCGCTGAGGTGTTC	PCR
PDE2A_totR2	AGAGGGATCCGCTGAGGT	PCR
PDE2A_A1_D1	GCCAGCAGGTCTTCCTCA	PCR
PDE2A_A1_D2	GACCCCTTGACACAGAAG	PCR
PDE2A_A1_R1	AGGCTCAGCAAAGCATCC	PCR
PDE2A_A2_D1	AGCATGGTCCTGGTGTTC	PCR
PDE2A_A2_D2	TACGAGCATGGTCCTGGTGT	PCR
PDE2A_A2_R1	TTGGACAACAGCGATGAGG	PCR
PDE2A_A2_R2	GAATTGGACAACAGCGATGA	PCR
PDE2A_A3_D1	GGCAGATGATGAGGAGTGATG	PCR
PDE2A_A3_D2	CAGGAGCCAGCAGTACCC	PCR
PDE2A_A3_R1	GGCTTGAGGAAGACCTGCT	PCR
PDE2A_A3_R2	AGGCTCAGCAAAGCATCC	PCR
PDE3A_totD1	ACAAATGCTTTCCTGGTTGC	PCR
PDE3A_totD2	GGAGTTGATGGCCCTGTATG	PCR
PDE3A_totR1	CCACATGGTCCAGGTTAACTAAG	PCR
PDE3A_totR2	GGAACGGTCATTGTACAGCA	PCR
PDE3A_A1_D1	GATTCCGGGGTGGGAAGAG	PCR
PDE3A_A1_D2	AGACCTTACCTGGCATACTTGG	PCR
PDE3A_A1_R1	CTCTCTTGTGGTCCCATTCTG	PCR
PDE3A_A1_R2	CGCCTCCTCCTCTTCCAC	PCR
PDE3A_A23_D1	GAAAGGAGAGCAAGATACCAATTT	PCR
PDE3A_A23_D2	GAAGGCAAGAAGCAAAGGAA	PCR
PDE3A_A23_R1	TCTCTTGTGGTCCCATTCTGA	PCR
GAPDH_1af	TCTTGTGCAGTGCCAGCCTC	PCR
GAPDH_2af	CAAGAAGGTGGTGAAGCAG	PCR
GAPDH_3af	GAAACCCATCACCATCTTCC	PCR
GAPDH_1ar	CAAGAGAAGGCAGCCCTGGT	PCR
GAPDH_1br	TGGTAACCAGGCGTCCGATAC	PCR
GAPDH_1cr	CGTTGAACTTGCCGTGGGTA	PCR
GAPDH_2ar	CAAAGGTGGAAGAATGGGAG	PCR
GAPDH_3ar	TCCACGACATACTCAGCAC	PCR
PDE2A_A1_D1int	CGCTTCTCCCTGTTACCCAG	PCR
PDE2A_A1_D2int	CCATCCACTGAGCTCTCACC	PCR
PDE2A_A1_R1int	TCCCTGGACTCAGGACTCTG	PCR
PDE2A_A3_D1int	CCCTTGCTAGTACTCACGGC	PCR
PDE2A_A3_D2int	TGTCCCCAGCAGGATCAAAC	PCR
PDE2A_A3_R1int	TACGAGCATGGTCCTGGTGT	PCR
PDE3A_A23_D1int	TGGGGACTCTTGGCTAGTTG	PCR
PDE3A_A23_D2int	TGATCCACAGCCAATCCAT	PCR
PDE3A_A23_R1int	ACTACCCTTCTGTCTTCACAGC	PCR

prU6_dir1	ACTGGATCCGGTACCAAGG	PCR
prU6_dir2	TCTAGATGCATGCTCGACTGG	PCR
CMVenh_rev1	CCGTAAATAGTCCACCCATTG	PCR
Pde3A_int11d1	TGTATGAACTACCATGTCTATGCTTCTTG	PCR
Pde3A_int12r1	ACCAAGGCCTCTAAACATTCTCTCTG	PCR
Pde3A_int11d1b	AACTACCATGTCTATGCTTCTTGCT	PCR
Pde3A_int12r3	TCCTTCCTGGGTGATCGTAG	PCR
Pde3A_int11d2b	CGTTTGTGGTTTGTACGTTGTATT	PCR
Pde3A_int12r3	TCCTTCCTGGGTGATCGTAG	PCR
Pde2A_int7d1	TGAGCAGGGGCTGGAGAAAAC	PCR
Pde2A_int8r1	TCCACAAGACCACCCAGAAGAC	PCR
Pde2A_int7d1b	CAGGGGCTGGAGAAAAC	PCR
Pde2A_int8r3	TCCTATAGACCTGCCCCGAGTT	PCR
Pde2A_int7d3	AAGGTATGCCACCACTCTG	PCR
Pde2A_int8r3	TCCTATAGACCTGCCCCGAGTT	PCR

2.1.6 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 6 verzeichnet

Tabelle 6: Plasmide

Plasmid	Ursprung
pDNR221_cas9	TRAM
pDNR221_U6gRNA	TRAM
pAD	Prof. Viacheslav Nikolaev

2.1.7 Antikörper

In dieser Arbeit wurden primäre und sekundäre Antikörper für die Westernblotanalyse verwendet. Die zu untersuchenden primären Kardiomyozyten stammen aus Isolationen adulter und neonataler Rattenherzen.

2.1.7.1 Primäre Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 7 verzeichnet

Tabelle 7: Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung, Spezies, Inkubationsbedingungen,	Hersteller, Katalognummer
Anti-GAPDH	1:160.000 in 5% Milch; ms; 1 h RT	Bio Trend #5G4
Anit-PDE2A	1:500 in 3% BSA; rb; 4°C ü.N.	Fabgennix #PD2A-101AP
Anti-PDE3A	1:1.000 in 3% Milch; rb; 4°C ü.N.	C. Yan
Anti-Cas9	1:2000 in 5% Milch; ms; 4°C ü.N.	Cell signaling Technology, #14697

ms, Maus; rb, Hase

2.1.7.2 Sekundäre Antikörper

In dieser Arbeit wurden in Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierte Antikörper verwendet. Die Antikörper wurden im selben Puffer verdünnt, wie die komplementären primären Antikörper (Tabelle 7). Die verwendeten sekundären Antikörper sind in Tabelle 8 verzeichnet

Tabelle 8: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung, Inkubationsbedingungen,	Hersteller, Katalognummer
Goat anti-mouse	1:5.000; 1 h RT	Biorad #170-5047
Goat anti-rabbit	1:5.000; 1 h RT	Biorad #170-5046

2.1.8 Chemikalien und Substanzen

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Substanzen sind in Tabelle 9 verzeichnet

Tabelle 9: Chemikalien und Substanzen

Chemikalien und Substanzen	Hersteller	Katalognummer
Acrylamide (Rotiphorese Gel 40)	Carl Roth	3029.1
Agarose universal peqGold	VWR	35-1010
Agarose, Plaque GP	Biozym	840101
Ammonium persulfate (APS)	Sigma Aldrich	A3678-25G
Ampuwa Wasser	Fresenius, Kabi Pac	40 676.00.00
BAY 41-2772	Sigma Aldrich	B8810
Betaine	Thermofischer	164550010
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich	M6250-100ML
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma Aldrich	A6003-25G
Bromphenolblue	Carl Roth	A512.1
Cilostamide	Santa Cruz	sc 201180A
CsCl	Sigma Aldrich	C3032-100G
Developer concentrate	Adefodur	00176
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich	D8418
DNS ladder, 100 bp	New England biolabs	N3231S
dNTP mix	Promega	U1511
Ethylenediaminetetraacetic (EDTA)	acid AppliChem	A1104,0500
Ethidiumbromid	Thermofischer	15585011
Ethanol, Rotipuran, >99.8% p.a.	Carl Roth	9065.2
Glycerol	Sigma Aldrich	G5516-100ML
Gene Pulser Electroporation Buffer	BioRad	1652676
HCl, 37%	Carl Roth	9277.1
Immersion liquid type F	Leica	11515859
3-Isobutyl-1-Methylxanthine (IBMX)	AppliChem	A0695-0001
Isoflurane (Forene)	Abbvie	B506
Methanol	Carl Roth	4627.24

Midori Green	Nippon Genetic	MG04
Milchpulver	Carl Roth	T145.1
NaCl	Merck	3957.1
NaOH	Chemsolute	1340.1000
Polyethylene Glycol 8000 (PEG 8000)	Th.Geyer	RO/00002632/001000
Ponceau S solution	Sigma Aldrich	P7170
Protein Marker V peqGold	Peqlab	27-2210
RNase ERASE	MP Biomedicals	821682
RNase-free water	GE Healthcare	B-003000-WB-100
SDS, Sodium dodecyl sulfate	Sigma Aldrich	05030
SDS-Solution, 20%	AppliChem	A0675,0500
Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer	AppliChem	A1691
Taurine	AppliChem	A1141,1000
TEMED, Tetramethylethylenediamine	Sigma Aldrich	T9281-100ML
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth	4855.2
Triton X-100 Solution, 10%	AppliChem	A1287,0100
Tween 20	Sigma Aldrich	P1379-500ML

2.1.9 Enzyme und Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Kits sind in Tabelle 10 verzeichnet.

Tabelle 10: Enzyme und Kits

Enzyme und Kits	Hersteller	Katalognummer
Collagenase Type 1 (ACT 323 u/mg)	Worthington	LS 004197
DNase I	Roche	11284932001
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche	11754785001
IscripT cDNS synthesis kit	BioRad	170-8890
LR-Clonase II Enzymmix	Invitrogen	11791-020
PCR purification kit Qiaquick	Qiagen	28104
Phosphatase inhibitor cocktail	Roche	04 906 837 001
Pierce BCA Protein assay kit	Thermo Scientific	23227
Protease inhibitor cocktail	Roche	04 693 116 001
Protease inhibitor w/o EDTA	Roche	11 836 170 001
Proteinase K	Appli Chem	A3830,0500
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	27106
Rapid DNA Dephos & Ligation Kit	Roche	04898117001
RNeasy fibrous tissue mini kit	Qiagen	74704
Rotor-Gene Multiplex PCR Kit	Qiagen	204772
Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit	Qiagen	204074
SuperSignal West Pico PLUS	Thermo Fisher	34580
T4 DNA ligase	New England Biolabs	MO202L
Trypsin, 2.5%	Gibco	15090-046

2.1.10 Verbrauchsmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 11 verzeichnet.

Tabelle 11: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Katalognummer
6-well plates	Falcon A-corning	351146
96-well plates	Thermo Scientific	167008
Bacillol 30 Foam	Hartmann	ANY8.1
Filterpapier, Type 598	Hahnemühle	5984657
Gelloader Pipette Tips	Sarstedt	70.1190.100
Lens cleaning tissue	Whatman	2105-841
Microcentrifuge tube	Roth	4190.1
Nitrocellulose Membrane, 0.45 µM	Amersham	10600002
Omnican 40, Insulin syringe	Braun	9161635
PCR 0.1 mL 4-tube & 4-cap strips	Biozym	711200
Pipette tips 10 µL	Sarstedt	70.1130.105
Pipette tips 100 µL	Sarstedt	70.760.107
Pipette tips 1000 µL	Sarstedt	70.762.105
Round glass cover slips 25 mm	VWR	631-0171
Safe Seal Reaktionsgefäße	Sarstedt	72.706.400
Serological pipette 2 mL	Sarstedt	86.1252.001
Serological pipette 5 mL	Sarstedt	86.1253.001
Serological pipette 10 mL	Sarstedt	86.1254.025
Serological pipette 25 mL	Sarstedt	86.1685.001
Serological pipette 50 mL	Sarstedt	86.1256.001
Sterilium	Bode	975512
Surgical scalpels, disposable	Braun	5518083
Transfer pipette	Sarstedt	86.1171.010
Tube 15 mL	Sarstedt	62.554.002
Tube 50 mL	Sarstedt	62.574.004
U-40 Insulin, 30Gx1/2	Braun	4001525
Vernichtungsbeutel	Labsolute	796994
X-ray film (Super RX)	Fujifilm	7410 19230
Zellkulturflasche T175	Greiner	660175

2.1.11 Ausstattung zum Mikroskop

Die in dieser Arbeit verwendete Ausstattung des Mikroskops ist in Tabelle 12 verzeichnet.

Tabelle 12: Ausstattung zum Mikroskop

Ausstattung zum Mikroskop	Hersteller
Arduino digital-to-analog input-output board	Arduino
CMOS camera (OptiMOS)	QImaging
DV2 Cube 05-EM, (505 dcxr, D480/30m, D535/40m)	Photometrics
DV2 Cube 11-EM, (565dcxr, 520/30m, D630/50m)	Photometrics
LED pE-100, 440 nm	CoolLED
LED pE-100 controller s/n 10949	CoolLED
Leica DMI1 microscope	Leica

Leica DMI 3000 B microscope	Leica
Leica M165FC microscope	Leica
Leica M50 microscope	Leica
Nikon eclipse Ti-4 microscope	Nikon
Nikon SMZ 745T microscope	Nikon
Strahlenteiler 455 LP	AHF Analysetechnik

2.1.12 Apparatur

Die in dieser Arbeit verwendete generelle Apparatur ist in Tabelle 13 verzeichnet.

Tabelle 13: Apparatur

Apparatur	Hersteller
Centrifuge 5810R	Eppendorf
Centrifuge Hareus Fresco 17	Thermo Scientific
CO ₂ -Incubator MCO-5AC	Sanyo
Dual flow meter (HMIC3D)	Billups Rothenberg
Fridge Comfort	Liebherr
Gene Touch	Bioer
Glacier Ultralow Temperature Freezer	Nuaire
Laboklav	HSP
LightCycler 480 Probes Master	Roche
Magnetic stirrer color squid	IKA
Medical film processor (SRX-101A)	Konica Minolta
Micro Ultracentrifuge CS150 FNX	Hitachi
Microwave	Panasonic
Präzisionswaage PCB1000-2	Kern
Rotor Gene Q	Qiagen
RCT standard Magnetprüher	IKA
Shaker DRS-12	ELMI
Spectrophotometer DS-11	Denovix
Thermomixer C	Eppendorf
Vortex-2 genie	Scientific industries
Water bath	GFL

2.1.13 Software

Die in dieser Arbeit verwendete Software ist in der Tabelle 13 verzeichnet.

Tabelle 13: Softwares

Softwares	Hersteller
APE	M. Wayne Davis
GraphPadPrism 6, 6.01	GraphPad
ImageJ, 1.44n9	National Institutes of Health
Endnote, X8.2	Web of Science Group
EditSeq	DNASTAR Lasergene

Micro-Manager, 1.4.5
 Microsoft Office Professional Plus 2013
 Powerlab 8/30
 PrimerSelect
 Rotor Gene Q analysis software
 SeqBuilder
 SeqMan Pro

Open Imaging
 Microsoft
 ADInstruments
 DNASTAR Lasergene
 Qiagen
 DNASTAR Lasergene
 DNASTAR Lasergene

2.1.14 Lösungen und Puffer

2.1.14.1 Lösungen und Puffer für Virusamplifikation, Aufreinigung und Plaque assay

Tabelle 14: HEK293A Kulturmedium für Virusamplifikation

Zusammensetzung	Volumen/Endkonzentration
DMEM	500 mL
FCS	10%
Glutamin	1%
Penicillin/Streptomycin	1%
Lagerung bei 4°C	

Tabelle 15: 20% Triton/PBS

Zusammensetzung	Volumen
Triton-X-100	10 mL
PBS, warm	40 mL
Lagerung bei 4°C	

Tabelle 16: 20% PEG 8000/2.5M NaCl

Zusammensetzung	Masse/Volumen
NaCl	292.6 g
20% PEG 8000	400 g
ddH ₂ O	Auf 2 L auffüllen
Lagerung bei 4°C	

Tabelle 17: PBS

Zusammensetzung	Volumen
PBS	500 mL
pH 8.0 Lagerung bei 4°C	

Tabelle 18: 10 x Sucrose-Puffer

Zusammensetzung	Masse/Volumen
Tris	24.22 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	8.13 g
D-(+)-Sucrose	800 g
ddH ₂ O	Auf 2 L auffüllen
pH 8.0. Lagerung bei 4°C	

Tabelle 19: 2 x IMDM

Zusammensetzung	Masse/Volumen
IMDM	Pulver aus 2 Flaschen
NaHCO ₃	6.05 g
ddH ₂ O	Auf 2 L auffüllen
Lagerung bei -20°C	

Tabelle 20: 1.5% Agarose

Zusammensetzung	Masse/Volumen
Agarose	1.5 g
ddH ₂ O	100 mL
Lagerung bei 4°C	

Tabelle 21: Plaque assay Medium

Zusammensetzung	Masse
Iscove Basal Medium	500 mL
FCS	5%
Antibiotikum/Antimycotikum	1%
Lagerung bei 4°C	

2.1.14.2 Lösungen und Puffer für die Zellkultur eukaryotischer und prokaryotische Zellen

Tabelle 22: HEK293A Kulturmedium

Zusammensetzung	Volumen/Endkonzentration
DMEM	500 mL
FCS	10%
Glutamin	1%
Penicillin/Streptomycin	1%

Lagerung bei 4°C

Tabelle 23: LB Medium

Zusammensetzung	Volumen/Masse
Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
ddH ₂ O	Auf 1 L auffüllen

Autoclavieren, Lagerung bei 4°C

Tabelle 24: SOC Medium

Zusammensetzung	Endkonzentration
Tryptone	1 %
Yeast Extract	0,5 %
NaCl	172 mM
Glucose	20 mM

verdünnt in H₂O, pH 7.4, 9.0 mL Aliquots werden bei -20°C gelagert

Tabelle 25: Amp¹⁰⁰ Agaroseplatte

Zusammensetzung	Volumen/Masse
Agar	15 g/l
Yeast Extract	10 g/l
NaCl	10 g/l
Trypton	Auf 1 L auffüllen
Ampicillin	100 µg/ml
X-gal 20 mg/ml	40 µl
IPTG 0.1M	40 µl

Autoclavieren, Lagerung bei 4°C

2.1.14.3 Lösungen und Puffer für die Isolation und Kultivierung primärer adulter Rattenkardiomyocyten

Tabelle 26: 10x Perfusionspuffer

Zusammensetzung	Endkonzentration/Volumen
NaCl	120,4 mM
KCl	14,7 mM
KH ₂ PO ₄	0,6 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,6 mM
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,2 mM
HEPES	10 mM

H₂O (Ampuwa)

auf 1 L auffüllen

pH 7.4

Tabelle 27: 1x Perfusionspuffer

Zusammensetzung	Endkonzentration/Volumen
10xPerfusion buffer	100 ml
NaHCO ₃	4,6 mM
Taurin	30 mM
BDM	10 mM
Glucose	5,5 mM
H ₂ O	auf 1 L auffüllen

Tabelle 28: Vardauungslösung

Zusammensetzung	Endkonzentration/Masse/Volumen
Collagenase Typ II	0,1 g
CaCl ₂	40 µM
1xPerfusion buffer	50 ml

Tabelle 29: Stop Puffer

Zusammensetzung	Endkonzentration/Volumen
BCS	10 %
CaCl ₂	12,5 µM
1xPerfusion buffer	auf 130 ml auffüllen

Tabelle 30: Ca Stop Puffer 1

Zusammensetzung	Endkonzentration/Volumen
Ca	100 µM
Stop Puffer	25 ml

Tabelle 31: Ca Stop Puffer 2

Zusammensetzung	Endkonzentration/Volumen
Ca	400 µM
Stop Puffer	25 ml

Tabelle 32: Ca Stop Puffer 3

Zusammensetzung	Endkonzentration/Volumen
------------------------	---------------------------------

Ca	900 µM
Stop Puffer	25 ml

2.1.14.4 Lösungen und Puffer für die Isolation und Kultivierung primärer neonataler Rattenkardiomyozyten

Tabelle 33: Verdauungslösung

Zusammensetzung	Masse/Volumen
PBS	75 ml
Trypsin	0,03 g
Collagenase Typ 2	0,075 g

in lichtgeschützter Flasche steril filtrieren und auf 37°C vorwärmen

Tabelle 34: Gelatin

Zusammensetzung	Masse/Volumen
Gelatin	2g
0.1N HCl	100 ml

Lagerung bei RT

Tabelle 35: Ara-C Aliquot

Zusammensetzung	Masse/Volumen
Cytosin β-D-Arabinofuranosid Hydrochlorid	100 mg
Steriles Wasser	37.5 ml

steril filtrieren und in 1 ml Aliquots bei -30 °C einfrieren

Tabelle 36: Kultivierungsmedium 1

Zusammensetzung	Volumen
Penicillin/Streptomycin	2,5 ml
Glutamin	2,5 ml
FCS	25 ml
DMEM/F12	220 ml

Tabelle 37: Kultivierungsmedium 2

Zusammensetzung	Volumen
DMEM	37,2 ml
M199	9.3 ml
FCS	2,5 ml
Penicillin/Streptomycin	0,5 ml

Glutamin

0,5 ml

2.1.14.5 Lösungen und Puffer für DNS- und RNS-Methoden

Tabelle 38: Bindepuffer

Zusammensetzung	Masse/Volumen
Guanosine Hydroxychlorid $\text{CH}_5\text{N}_3\text{HCl}$	191 g
H_2O	417 ml
3M Kaliumacetat (pH 4,2)	83 mL
für 500 mL	

Tabelle 39: Guanidin Waschpuffer

Zusammensetzung	Masse/Volumen
Guanosine Hydroxychlorid $\text{CH}_5\text{N}_3\text{HCl}$	238,8 g
H_2O	312 ml
Ethanol	188 mL
für 500 mL	

Tabelle 40: Waschpuffer

Zusammensetzung	Masse/Volumen
5M NaCl	2 mL
1M Tris-HCl, pH 7,5	1 mL
H_2O	97 mL
Ethanol	400 mL
für 500 mL	

Tabelle 41: SDS 20%

Komponente	Volumen/Masse
SDS	200g
H_2O	auffüllen auf 1 L
pH 8.0	

Tabelle 42: TAE-Puffer (50x)

Komponente	Masse
Tris-HCl	2M
EDTA	0,05M
pH 8.0	

Tabelle 43: 6x Ladepuffer, Agarose-Gelelektrophorese

Komponente	Volumen/Masse
------------	---------------

Bromphenolblau	0,025%
Xylolcyanol	0,025%
EDTA	0,06M
Glycerin	30%

pH 8.0

Tabelle 44: 6% PAAG-Gel

Komponente	Volumen/Masse
H ₂ O	28,5 ml
TBE x 5	4,5 ml
Acrylamide 30% (19:1)	9 ml
APS 10%	450 µL
Temed	45 µL

Acrylamid 30% (19:1): 500 ml Acrylamide 150g/Bis-Acrylamide 7,9g)

2.1.14.6 Lösungen und Puffer für Protein biochemische Methoden

Homogenisierung von Proteinlysaten

Tabelle 45: Homogenisierungspuffer Stock

Zusammensetzung	Endkonzentration
EGTA	1mM
HEPES	10 mM
NaCl	150 mM
Sucrose	300 mM

verdünnt in H₂O, pH 7.4, 9.0 mL Aliquots werden bei -20°C gelagert

Tabelle 46: Homogenisierungspuffer

Zusammensetzung	Volumen
Homogenisierungspuffer Stock	9 mL
Triton X-100, 10%	1 mL
Phosphatase inhibitor	nach Hersteller
Protease inhibitor	nach Hersteller

0.5 mL Aliquots werden bei -20°C gelagert

SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Tabelle 47: SDS Stop 3x

Zusammensetzung	Endkonzentration
Tris	200 mM
SDS	6%

Glycerin	15%
Bromphenolblau	Abhängig von Farbintensität
β-Mercaptoethanol	10 %

verdünnt in H₂O, pH 6.7, gelagert bei RT

Tabelle 48: 4x Tris/SDS, pH 6.8

Zusammensetzung	Endkonzentration
Tris	500 mM
SDS	0.4%

verdünnt in H₂O, gelagert bei RT

Tabelle 49: 4x Tris/SDS, pH 8.8

Zusammensetzung	Endkonzentration
Tris	1.5 M
SDS	0.4%

verdünnt in H₂O, gelagert bei RT

Tabelle 50: APS

Zusammensetzung	Endkonzentration
APS	10%

verdünnt in H₂O, 0.5 mL Aliquots, gelagert bei -20°C

Tabelle 51: 10 x SDS Laufpuffer

Zusammensetzung	Endkonzentration
Tris	250 mM
Glycin	1.9 M
SDS	1%

verdünnt in H₂O, pH 8.3, gelagert bei RT

Tabelle 52: 10 x Transferpuffer

Zusammensetzung	Endkonzentration
Tris	325 mM
Glycin	1.9 M

verdünnt in H₂O, gelagert bei RT

Tabelle 53: 1 x Transferpuffer

Zusammensetzung	Endkonzentration
10 x Transferpuffer	1 x
Methanol	10%
verdünnt in H ₂ O, gelagert bei 4°C	

Tabelle 54: 10 x TBS Puffer

Zusammensetzung	Endkonzentration
Tris	100 mM
NaCl	1.5 M
verdünnt in H ₂ O, pH 7.5, gelagert bei RT	

Tabelle 55: 1x TBS-Tween Puffer

Zusammensetzung	Endkonzentration
1 x TBS Puffer	1 x
Tween 20	0.1 %
verdünnt in H ₂ O, gelagert bei Raumtemperatur	

Tabelle 56: Sammelgel

Zusammensetzung	Volumen
Acrylamid	500 µL
4 x Tris/SDS, pH 6.8	940 µL
ddH ₂ O	2.31 mL
APS, 10%	18.8 µL
TEMED	7.5 µL
Menge für 2 Gele (1.0 mm)	

Tabelle 57: Trenngel

Zusammensetzung	8%	10%
Acrylamid	3.2 mL	4.0 mL
4 x Tris/SDS, pH 8.8	3.0 mL	3.0 mL
ddH ₂ O	5.8 mL	5.0 mL
APS, 10%	48 µL	48 µL
TEMED	18 µL	18 µL
Menge für 2 Gele (1.0 mm)		

2.1.14.7 Lösungen und Puffer für FRET-basierte cAMP-Messungen in isolierten adulten und neonatalen Rattenkardiomyozyten

Tabelle 58: FRET-Puffer

Zusammensetzung	Endkonzentration
NaCl	144 mM
KCl	5.4 mM
MgCl ₂ x 7 H ₂ O	1 mM
CaCl ₂	1 mM
HEPES	10 mM

In Ampuwa H₂O gelöst, pH 7.4, Lagerung bei RT

2.2 Methoden

2.2.1 gRNS Design

Zunächst wurde die DNS-Sequenz der Gene und die mRNS-Sequenz der Isoformen festgestellt. Für den KO von PDE2A, PDE3A und derer Isoformen mittels CRISPR/Cas9 wurden mit Hilfe des „national centre for biotechnology information“ (NCBI) und des „University of California, Santa Cruz Genome Browser“ (UCSC) Unterschiede in den RNS-Sequenzen der Isoformen identifiziert. gRNS target Sequenzen haben eine Länge von ≈ 20 Nukleotiden und sind variabel und spezifisch für jede gRNS. Anschließend wurden die gRNS target Sequenzen jeweils in das gRNS expressierende Plasmid pDNR221_U6gRNA kloniert. Folgende Kriterien wurden bei der Erstellung der gRNS-target-Sequenzen beachtet:

- Für die Klonierung einer gRNS target Sequenz wurden jeweils zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide erstellt (Bsp.: PDE2AgRNA8_1d + PDE2AgRNA8_1r). Zusätzlich würde der DNS-Doppelstrang nach Hybridisierung zwei klebrige Enden besitzen (CACC, AAAC) und mit den Klebrigen Enden des mit *BbsI* geschnittenen Plasmids (pDNR221_U6gRNA) übereinstimmen (Abbildung 8).
- Die gRNS-target Sequenzen mussten eine geringe Off-target Wahrscheinlichkeit und einen hohen Doench et al. [162] und Moreno-Mateos [163] Effizienzscore besitzen.
- Die gRNS-target Sequenzen wurden vor einen U6 Promotor kloniert. Der U6 Promotor zeigt die höchste Effektivität, wenn das erste Nukleotid des Transkripts ein Guanidin ist. Demzufolge war darauf zu achten, dass das erste Nukleotid der gRNS-target Sequenz ein Guanidin ist.
- Es war ein Doppelstrangbruch im Exon des Gens beabsichtigt, denn ein Doppelstrangbruch in der Region des Promoters könnte durch die Aktivierung eines alternativen Promoters zu einem unvollständigen KO führen.
- Bei der Erstellung Isoform-spezifischer gRNS war darauf zu achten, dass nur Isoform spezifische DNS-Sequenzen von dem Doppelstrangbruch betroffen waren.
- Auch war für die Erstellung spezifischer Isoform-KO zu berücksichtigen, dass der Doppelstrangbruch nicht in dem im Intron lokalisierten Lariat-Fragment stattfindet. Anderenfalls wäre das Spleißen aller Isoformen betroffen.

Tabelle 59: gRNS für PDE2A, PDE3A und deren Isoformen

Totaler Gen-KO	Name	gRNS target Sequenz
PDE2A	PDE2A_13_1	CAGTCGAGCCACTGACCAGG
PDE2A	PDE2A_8_1	TGACCGAAAGATCCTGCAAC
PDE2A	PDE2A_8_3	GGCTCTGGTGGCCCTGCAGA
PDE3A	PDE3A_12_1	GGGTTTACACACGGACACAT
PDE3A	PDE3A_12_2	GTCTGGAAATATTCCAGCCC
Spezifischer Isoform KO		
PDE2A1	PDE2A_12_1	GAGTAGAGACGACCGACTGG
PDE2A1	PDE2A_12_2	GGGAGTAGAGACGACCGACT
PDE2A2	PDE2A_21_1	GGTGTTCACACATCCTC
PDE2A2	PDE2A_21_2	CATCGCTGTTGTCCAATTCC
PDE2A3	PDE2A_31_1	GCTGAGCCGTGAGTACTAGC
PDE2A3	PDE2A_31_3	GCGGCCACTCCATCCTCTGC
PDE3A1	PDE3A_1_1	GACTAGCGCCCTCAGGACGG
PDE3A1	PDE3A_1_2	GGTCGCCTGGAGACCTTACC
PDE3A2 und PDE3A3	PDE3A_A1_1	GAGGCTGGCTTTGTCAGGTG
PDE3A2 und PDE3A3	PDE3A_A1_2	AGGCTGGCTTTGTCAGGTGA

2.2.2 Primer Design

In dieser Arbeit wurden PCR und qPCR bei der Kontrolle der Viruspartikel und Ermittlung des Genexpressionslevels durchgeführt. Folgende Kriterien wurden beim Primer Design beachtet

- Die Hybridisierungstemperatur T_a der Primer musste zwischen 50°C und 60°C liegen.
- Der Unterschied in der T_a beider Primer durfte nicht größer als 5°C betragen.
- Der Gehalt an Guanidin und Cytosin liegt über 50%, wodurch der Gehalt an Adenosin und Thymidin unter 50% liegt. Die Erhöhung des Gehalts an Guanidin und Cytosin macht die Primer deutlich spezifischer.
- Primer, die Haarnadelstrukturen bilden könnten, wurden vermieden.

2.2.3 Klonierung der gRNS

Phosphorylierung und Hybridisierung der Oligonukleotide

Die bestellten Oligonukleotide liegen im nicht phosphorylierten Zustand vor und wurden zunächst phosphoryliert und hybridisiert.

Tabelle 60: Versuchsbedingungen 1, Phosphorylierung und Hybridisierung der Oligonukleotide

Zusammensetzung	Volumen
T4 PNK buffer (NEB) (x10)	1 µL
H ₂ O	7 µL
Primer vor. (100 pM/µL)	1 µL
Primer rü. (100 pM/µL)	1 µL
T4 PNK (NEB) (10U/µl)	0,5 µL

Tabelle 61: Versuchsbedingungen 2, Phosphorylierung und Hybridisierung der Oligonukleotide

Schritt	Temperatur in °C	Dauer in Minuten
1	30	30
2	93	5
3	93 - 20	Temperaturabnahme 5°C/Min
4	4	unbegrenzt

Im Gene Touch thermal cycler (Bioer) durchgeführt und bei -20° C eingefroren.

Ligation der Oligonukleotide in pDNR221 U6gRNA/BbsI

Die Oligonukleotide wurden 1:250 verdünnt und mit mit pDNR221_U6gRNA vermischt, welche mit BbsI zuvor verdaut wurde. Die klebrigen Enden des Oligonukleotid DNS-Doppelstranges sind komplementär zu den klebrigen Enden des Plasmids und die T4 DNS Ligase vermittelt die Ligation.

Tabelle 62: Versuchsbedingungen 1, Ligation

Zusammensetzung	Volumen
Oligonukleotide	1 µL
pDNR221_U6gRNA/BbsI (146 ng/µl)	1 µL
H ₂ O	16 µL
10X T4 ligation buffer with ATP	2 µL
T4 DNA ligase (400U/µl)	0,5 µL

Tabelle 63: Versuchsbedingungen 2, Ligation

Schritt	Temperatur	Dauer in Minuten
1	16 °C	10
	10 °C	1
2 Wiederhole Schritt 1	3x	
3	4 °C	unbegrenzt

Im Gene Touch thermal cycler (Bioer) durchgeführt und bei -20° C eingefroren.

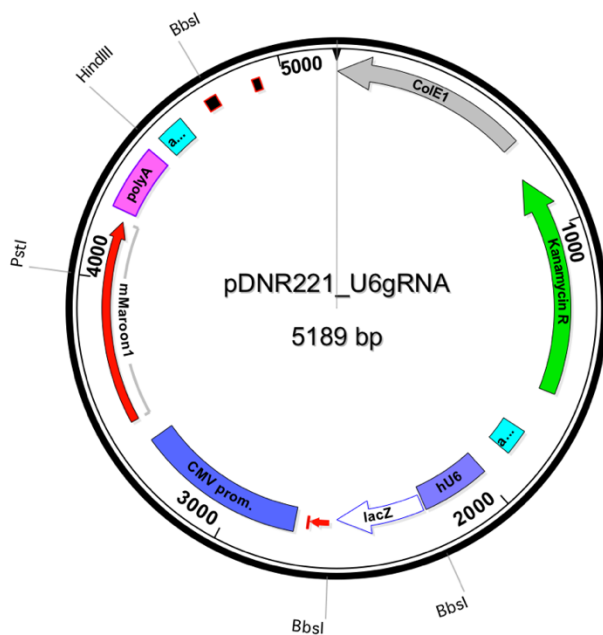


Abbildung 8: pDNR221_U6gRNA Plasmid

Dargestellt ist das pDNR221_U6gRNA Plasmid vor der Klonierung der gRNA target Sequenz. Das Plasmid hat eine Länge von 5189 BP. „ColE1“ (grau) steht für den Replikationsursprung des Plasmids. „Kanamycin R“ (grün) verleiht dem Bakterium eine Resistenz gegen Kanamycin. Zwei türkise Balken stehen für die „Gateway att“ Abschnitte, eine Voraussetzung für die LR-Rekombination. „hU6“ (hellblau) steht für den hU6 Promotor. „lacZ“ (weiß) steht für die den LacZ β -galactosidase kodierenden DNS-Abschnitt. Ein roter Pfeil steht für die gRNA-Sequenz (ohne der gRNA target Sequenz). „CMV prom.“ (dunkelblau) steht für den CMV-Promotor. „mMaroon1“ steht für den Maroon kodierenden DNS-Abschnitt. „polyA“ (pink) steht für den Poly-A-Schwanz kodierenden Abschnitt. Durch die Klonierung wird der β -galactosidase kodierenden DNS-Abschnitt, welcher von zwei BbsI-Erkennungssequenzen eingeschlossen wird, durch die gRNA target Sequenz ersetzt.

Elektroporation der Plasmide in XL1-Blue MRF'

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der partiellen Zerstörung der bakteriellen Zellmembran durch einen elektrischen Impuls. Kompetente XL1-Blue MRF' Zellen wurden bis zur log-Phase wachsen gelassen, zentrifugiert mit eiskaltem H₂O gewaschen, um die Konzentration der Ionen zu vermindern und in eiskaltem Elektroporationspuffer aufgelöst. 0,5 μ L des Ligationsgemisches wurde in 25 μ L H₂O verdünnt und den Bakterien zugegeben. Schließlich wurden die Bakterien durch einen 2.5 kV, 400 Ohm and 25 mF starken elektrischen Impuls elektroporiert. Der Zellsuspension wurde 500 ml SOC Medium zugegeben und sie wurde für 1h bei 37°C inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden auf Kan⁵⁰-Platten verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Selektion der positiven Klone

E. coli Kolonien, bei denen die Transformation mit den rekombinanten Plasmiden erfolgreich war, wurden mit selektiven Markern detektiert. Zum einen besitzt der Plasmid Vektor ein Gen für Kanamycinresistenz und nicht-transformierte Bakterien proliferieren nicht. Des Weiteren trägt pDNR221_U6gRNA vor der Klonierung die N-terminale Sequenz des LacZ Gens, welche für β -galactosidase kodiert. β -galactosidase ermöglicht die Hydrolyse von X-Gal, wodurch die Bakterien blau erscheinen. Bei erfolgreicher Klonierung wird LacZ durch die gRNA target Sequenz ersetzt und die Bakterien erscheinen weiß.

Miniprep

Die Bakterien sind in 3 mL LB-Medium über Nacht gewachsen. Die Isolation der Plasmid DNS wurde mit dem „High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche)“ (Tab. 10) nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die Methode beruht auf der alkalischen (pH 12 – 12,5) Denaturierung der linearen chromosomalen DNS. Dabei denaturiert die zirkuläre Plasmid DNS nicht.

Sequenzierung

Die DNS-Sequenzierung ist eine abgewandelte Form der PCR und wurde 1975 von Sanger und Coulson entwickelt. In dieser Arbeit wurde die DNS-Sequenzierung der amplifizierten

Fragmente von MWG Eurofins Genomics durchgeführt. 200 ng der PCR-Produkte wurden mit 0,01 femtomole (fM) Primer in 20 µL Wasser verdünnt und zu Sequenzierung geschickt.

2.2.4 Gateway LR Rekombination

Das Gateway Cloning System ist eine molekularbiologische Methode, welche Wissenschaftlern erlaubt DNS-Fragmente zwischen zwei Plasmiden auszutauschen. Die Rekombination wird durch „Gateway att“ Abschnitte in der DNS und die Enzyme LR Clonase und BP Clonase vermittelt. Im Folgenden sind die Versuchsbedingungen für die LR-Rekombination zwischen dem pAD-Plasmid und der für die gRNS kodierenden DNS-Proben beschrieben.

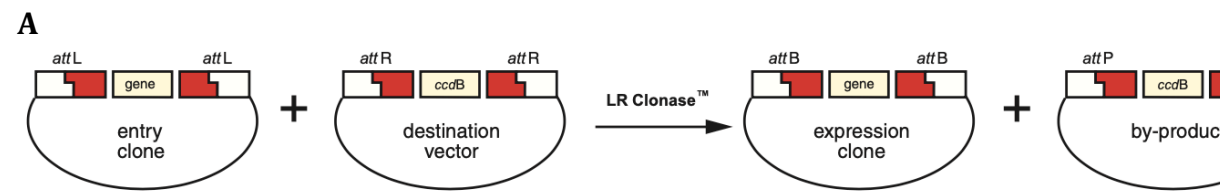


Abbildung 9: Schematische Darstellung der LR-Rekombination
 Der „entry clone“ (das pDNR221_U6gRNS Plasmid) besitzt att L-Abschnitte am Rand der DNS-Sequenz, die rekombiniert wird. Der „destination vector (pAd Plasmid)“ besitzt att R-Abschnitte am Rand der DNS-Sequenz, die ausgetauscht wird. Beim Zufügen der LR Clonase wird die DNS-Sequenz, die sich zwischen att L-Abschnitte befindet mit der DNS-Sequenz, die sich zwischen att R-Abschnitte befindet, ausgetauscht (abgewandelt von Gateway Technology).

Tabelle 64: Versuchsbedingungen LR Rekombination

Komponente	Volumen/Masse
pAD (Plasmid)	150 ng
DNS-Proben	150 ng
LR-Clonase II Enzymmix	2 µl
TE Puffer	Auf 8 µl auffüllen
ü.N. bei 25°C im Eppendorf ThermoMixer®	

Proben wurden mit 500µl 75% Ethanol (-20°C) gewaschen, 10 Min. bei 13,3 rpm zentrifugiert, der Überstand, wurde wieder verworfen und die Suspension trocknete für 10 Min. Anschließend wurde die DNS mit 10µl Wasser resuspendiert.

Transduktion

Für die Transduktion wurde die linearisierte DNS mit 300 µl DMEM und 7 µl Lipofectamin für 20 min bei RT inkubiert und dann HEK 293a Zellen zugegeben.

2.2.5 Adenovirale Amplifikation und Purifizierung

Amplifikation

In dieser Arbeit wurden adulte und neonatale KM mit cas9, gRNS und Epac1-camps expressierenden adenoviralen Vektoren transduziert. Diese Adenoviren wurden anhand des folgenden Protokolls amplifiziert. Die Amplifikation in HEK293A Zellen fand in drei Etappen statt, in denen sich die Menge an HEK293 Zellen und Dauer der Kultivierung nach Transduktion änderte (siehe Tabelle 67). Die Zellen wurden stets bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Nach jeder Etappe wurden die Zellen durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff und nachfolgendem Auftauen lysiert. Das Supernatant wurde für die weitere Amplifikation verwendet. In der zweiten und dritten Etappe wurde das HEK293A Kulturmedium für Virusamplifikation 2h nach Transduktion erneut gewechselt.

Tabelle 67: Adenovirale Amplifikation

Etappe	Platten mit HEK293A Zellen	Dauer der Kultivierung nach Transduktion
1	10 cm Platten	48 – 72 h
2	T175 Platten	72 – 96 h
3	Easy fill tray System	72 h

Aufreinigung

Das Virus wurde mittels CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Zunächst wurde das Supernatant mit Triton-X-100/PBS (Endkonzentration 0,1%) in einem Shaker inkubiert (30 min, 900 rpm) und zentrifugiert (4000 rpm, 1h, 4°C). Damit die Virus-DNS präzipitiert, wurde dem Supernatant im Verhältnis 1:1 20% PEG 8000/2.5 M NaCl zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung zentrifugiert (4000 rpm, 1h, 4°C) und in 11,5 ml PBS resuspendiert. Die Suspension wurde in einen 15 ml Tube transferiert und zentrifugiert (2000 rpm, 2 min, RT). Dem Supernatant wurde CsCl zugegeben (Endkonzentration 1.33 g/ml) und die Lösung wurde ultrazentrifugiert (40000 rpm, 24h, 16°C). Die Virus Bande wurde mit einer Spritze abgezogen und mit 1x Sucrose Puffer inkubiert (ü.n., 4°C). Am nächsten Tag wurde der 1x Sucrose Puffer durch frischen Puffer ausgetauscht und die Lösung erneut inkubiert (ü.n., 4°C). Die physische Konzentration des Virus wurde mit optischer Dichtemessung bestimmt (OD₂₆₀ nm). Die Suspension wurde mit sterilem Glycerol versetzt (Endkonzentration 10%), aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.2.6 Kontrolle der Viren

Lyse

Die Viren wurden durch folgendes Protokoll lysiert.

Tabelle 68: Versuchsbedingungen, Lyse der Viren

Zusammensetzung	Endkonzentration
Viruslysat	200 µL
5M NaCl	6 µL
20 % SDS	10 µL
20 mg/ml Proteinase K	5 µL

2h bei 55°C; die Lyse wurde durch 5 min Inkubation bei 95 °C unterbrochen.

DNS waschen

Jeder Probe wurde 1 ml Bindepuffer dazugegeben und die Proben wurden auf Filtern 1-mal mit Guanidin Waschpuffer und 3-mal mit Waschpuffer gewaschen. Das DNS Lysat wurde anschließend in 50 µL Wasser eluiert.

Gradient PCR und nested PCR

Bei der Gradient PCR wird der zweite und vierte Schritt jeweils 11-mal wiederholt. Bei jeder Wiederholung ändert sich die Temperatur, bei welcher die Primerhybridisierung abläuft. Die Temperaturen der Primerhybridisierung ist in Tabelle 70 und 71 dargestellt.

Tabelle 69: Versuchsbedingungen 1, Gradient PCR

Zusammensetzung	Volumen
DNS Lysat	3 µL
PCR Puffer (x10)	30 µL
DNTP 10mM (x50)	6 µL
DMSO	15 µL
Betaine 5M	60 µL
H ₂ O	190 µL
Primer forward (100pM/µL)	1 µL
Primer reverse (100pM/µL)	1 µL
TaqM (50U/µL)	2 µL

Tabelle 70: Versuchsbedingungen 2, Gradient PCR

Schritt	Temperatur in °C	Dauer
1	93 °C	2 Min
2 Denaturierung	93 °C	20 Sek
Primerhybridisierung	58.1 °C (ΔT -1°C; Gradient 10)	20 Sek
Elongation	67 °C	40 Sek
3 Wiederhole Schritt 2	11x	
4 Denaturierung	93 °C	20 Sek
Primerhybridisierung	46.1 °C (ΔT -1°C; Gradient 20)	20 Sek
Elongation	67 °C	40 Sek
5 Wiederhole Schritt 4	25x	
6	67 °C	2 Min

Im Gene Touch thermal cycler (Bioer) durchgeführt

Tabelle 71: Versuchsbedingungen 3, Gradient PCR

Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10	Probe 11	Probe 12
53.1°C	53.3°C	54.0°C	55.1°C	56.3°C	57.5°C	58.7°C	59.9°C	61.1°C	62.2°C	62.9°C	63.1°C
36.1°C	36.6°C	38.0°C	40.1°C	42.5°C	44.9°C	47.3°C	49.7°C	52.0°C	54.2°C	55.6°C	56.1°C

Anschließend erfolgte ein nested PCR der Proben. Dafür wurden andere Primer verwendet und Anstatt des DNS Lysats 3 µL des PCR-Produkt der Gradient PCR verwendet. Ansonsten blieben die Versuchsbedingungen gleich.

Gelelektrophorese

Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer in 0,8 % Agarose-Gel (in 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt) für 2 h bei 120 Volt in TAE-Puffer laufen gelassen.

Sequenzierung

Der Ablauf der Sequenzierung wurde in Kapitel 2.2.3 beschrieben.

2.2.7 Zellkultur Techniken

HEK293A Zellen, adulte und neonatale KM wurden bei 37°C und 5% CO₂ Gehalt kultiviert. Die Zellen wurden entweder auf 6-Well Platten oder, zusätzliche auf 25 mm Coverslips ausplatziert. Ein Transduktionsschema für neonatale KM mit adenoviralen Vektoren ist in Abbildung 11 dargestellt.

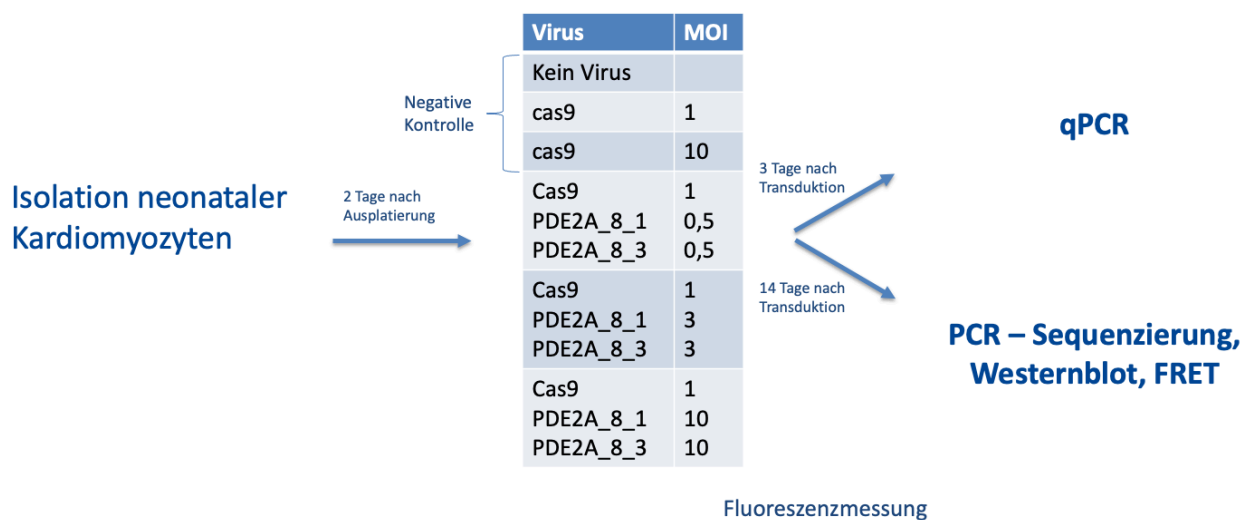


Abbildung 11: Experimenteller Ablauf am Beispiel des PDE2A-KO in neonatalen Kardiomyozyten

Beispielhafte Darstellung des experimentellen Ablaufs nach Isolation von Kardiomyozyten. Neonatale KM wurden zunächst 2 Tage in der Zellkultur gehalten. Bei der Transduktion wurde für die negative Kontrolle entweder kein Virus, oder nur der Cas9 expressierende Virus mit unterschiedlichen MOIs verabreicht. Für den KO wurde sowohl der Cas9 expressierende Virus als auch gRNS expressierende Viren mit unterschiedlichen MOIs verabreicht. Mit den Zellen erfolgten qPCRs, PCR- Sequenzierungen, Westernblots oder FRET-Experimente.

Tabelle 72: Epac1-camps, cAMP Biosensor

Name und EC₅₀	Design	Eigenschaften	Referenzen
Epac1-camps (Epac-basiert) cAMP EC ₅₀ = 2.4 μM	Einzelne cAMP- Bindedomäne von Epac zwischen CFP und YFP	Einzelne Kette. Gute Sensitivität. Kompaktes Design, einfach für targeting und Expression in vivo	[37, 156, 164- 169]

24 h vor der Durchführung von FRET-Experimenten wurden die KM mit dem Epac1-camps expressierenden Virus transduziert.

2.2.8 Organentnahme und Isolation adulter KM

Der Ratte wurde Heparin und eine Sedierung verabreicht. Das Sternum wurde eröffnet, die Herzen entnommen, in PBS übertragen und an eine Perfusionsanlage angeschlossen. Die Herzen wurden erst 1 min im Perfusionspuffer und danach 3 min in der Verdauungslösung inkubiert. Die Atrien wurden abgetrennt und entsorgt. Die Ventrikel wurden zerkleinert und mit Stop Puffer resuspendiert. Man ließ die Lösung 15 min sedimentieren, entnahm den Überstand und resuspendierte das Pellet wieder mit Stop Puffer. Dieser Vorgang wurde mit Ca Stop Puffer 1, Stop Puffer 2 und Stop Puffer 3 wiederholt. Die Zellen wurden zu ca. 10.000 auf lamininbeschichteten 6-Well Platten subkultiviert.

2.2.9 Organentnahme und Isolation neonataler KM

24 – 72 h alten Ratten (Tab. 1) wurde der Kopf abgetrennt und das Sternum eröffnet. Nach der Entnahme der Herzen und deren Übertragung in eiskaltes PBS wurden die Atrien von den Ventrikeln mittels Schere und Pinzette abgetrennt. Die Ventrikel wurden in 6 ml „Verdauungslösung“ (Tab. 33) übertragen und unter schwenkenden Bewegungen bei 37°C inkubiert. Die in der Verdauungslösung enthaltene Kollagenase und Trypsin sorgte für die Digestion der extrazellulären Matrix. Nach 12 min wurden, die im Supernatant enthaltenen verdauten Zellen entsorgt. Diese Schritte wurden 4-mal wiederholt, wobei während der weiteren Verdauung das Supernatant in das „Kultivierungsmedium 1“ (Tab. 36) übertragen und bei 37°C inkubiert wurde.

Nach der Digestion wurde die Zellsuspension bei RT bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert und das Supernatant wurde entsorgt. Die KM wurden in 20 ml „Kultivierungsmedium 1“ resuspendiert und von Fibroblasten getrennt, indem die Zellsuspension bei 37°C auf Petrischalen inkubiert wurde. Nach 45 min sind die Fibroblasten abgesunken und die KM befinden sich weiterhin in der Zellsuspension. Der Trennschritt wurde wiederholt und anschließend erfolgte die Zellzahlbestimmung mittels Anfärbung mit Trypanblau und Auszählung in einem Hämozytometer nach Neubauer. Die Zellen wurden zu 500.000 – 1.000.000 auf kollagen- oder gelatinbeschichteten 6-Well Platten mit je 2 ml „Kultivierungsmedium 1“ und 20 μl Ara-C (Tab. 35) subkultiviert. Nach 24 h wurde das „Kultivierungsmedium 1“ mit dem „Kultivierungsmedium 2“ (Tab. 37) ersetzt.

2.2.10 Fluoreszenzkontrolle transduzierter KM

An transduzierten neonatale und adulten KM wurden Fluoreszenzmessungen durchgeführt.

2.2.11 Nachweis eines KO auf Ebene der RNS

Isolation von RNS aus Ratten KM (RNeasy Fibrous Mini Kit)

Die Isolation von RNS aus adulten und neonatalen Ratten-KM erfolgte mit dem RNeasy Fibrous Mini Kit (Quiagen) (Tab. 10) nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die Quantifizierung der RNS erfolgte am Spectrophotometer DS-11 (Denovix) und die Proben wurden auf -80°C gelagert.

2.2.11.2 RT PCR

Für die Erzeugung von cDNA aus mRNA eignet sich die RT PCR welches auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruht [170]. Mittels iScript cDNA synthesis kit (BioRad) wurde aus isolierter RNS (Kapitel 2.2.12.1) cDNA gewonnen. Vor der RT-PCR wird durch Verdau mit DNase I eine Kontaminierung vorgebeugt (Tab. 73).

Tabelle 73: Versuchsbedingungen 1 iScript cDNA synthesis kit

Komponente	Volumen
Isolierte RNS	20 µL
ddH ₂ O	2,5 µL
DNase I	2 µL
Inkubation 30 min bei 37°C und danach 5 min bei 80°C	

Tabelle 74: Versuchsbedingungen 2 iScript cDNA synthesis kit

Zusammensetzung	Volumen/Masse
5 x iScript Reaktionsmix	4 µL
iScript reverse Transkriptase	1 µL
ddH ₂ O	auf 20 µL auffüllen
Isolierte RNS	200 ng
Totales Volumen	20 µL

Tabelle 75: Versuchsbedingungen 3 iScript cDNA synthesis kit

Schritt	Temperatur in °C	Dauer in Minuten
1	25	5
2	46	20
3	95	1
4	4	unbegrenzt

Im Gene Touch thermal cycler (Bioer) durchgeführt und bei -20°C eingefroren.

qPCR

Zur Bestimmung des Genexpressionslevels eignet sich die quantitative PCR [171]. Hierbei wird einer PCR-Reaktion ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) dazugegeben, welcher an doppelsträngige DNS bindet. Am Ende eines jeden Zyklus werden Fluoreszenzmessungen durchgeführt, womit die Zunahme an amplifizierter DNS abgeleitet werden kann. Die Primer für die qPCR sind in Tabelle (Tab. 5) verzeichnet. Von jeder Probe wurde ein Triplikat erstellt und die Amplifikation der cDNS erfolgte im Verhältnis zu einem Referenzgen (GAPDH) [172, 173] und einer negativen Kontrolle (ddH₂O).

Tabelle 76: Versuchsbedingungen 1 qPCR

Komponente	Volumen
SYBR Green	5 µL
Primer forward (5 nM)	0,5 µL
Primer reverse (5 nM)	0,5 µL
cDNA (1:1 Verdünnung)	1 µL
ddH ₂ O	3 µL
Totales Volumen	10 µL

Tabelle 77: Versuchsbedingungen 2 qPCR

Schritt	Temperatur	Dauer
1.	95°C	10 min
2.	95°C	10 sec
	60 °C	15 sec
	72°C	20 sec
3. Zyklus 2 wiederholen	39x	
4.	72°C – 95°C	0.5°C Schritte

In 0.1 ml Tubes, im 72 Well Rotor, im Rotor Gene Q cycler (Quiagen)

Die Daten wurden mit der Rotor Gene Q software (Quiagen) verarbeitet und die C_T Werte wurden mit $\Delta\Delta C_T$ Methode analysiert [174].

2.2.12 Nachweis eines KO auf Ebene der DNS

Für den Nachweis eines KO auf Ebene der DNS werden zunächst Rattenkardiomyozyten homogenisiert (Kapitel 2.2.13) und die DNS gewaschen (Kapitel 2.2.6).

PCR: Preamplifikation

Die Preamplifikation der DNS dient zur Erhöhung der Spezifität der nachfolgenden qPCR

Tabelle 78: Versuchsbedingungen 1, Preamplifikation

Zusammensetzung	Volumen
DNS Lysat	3 µL
PCR Buffer (x10)	30 µL
DNTP 10mM (x50)	6 µL

DMSO	15 µL
Betaine 5M	60 µL
H ₂ O	190 µL
Primer forward (100pM/µL)	1 µL
Primer reverse (100pM/µL)	1 µL
TaqM (50U/µL)	2 µL

Tabelle 79: Versuchsbedingungen 2, Preamplifikation

Schritt	Temperatur in °C	Dauer
1	93 °C	2 Min
2 Denaturierung	93 °C	20 Sek
Primerhybridisierung	64 °C (ΔT -1°C; Gradient 10)	20 Sek
Elongation	67 °C	40 Sek
3 Wiederhole Schritt 2	9x	
4 Denaturierung	93 °C	20 Sek
Primerhybridisierung	55 °C	20 Sek
Elongation	67 °C	40 Sek
5 Wiederhole Schritt 4	25x	
6	67 °C	2 Min
7	4 °C	unbegrenzt

Im Gene Touch thermal cycler (Bioer) durchgeführt

Tabelle 80: Versuchsbedingungen 3, Preamplifikation

Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
59,5°C	60,5°C	61,5°C	62,5°C	63,5°C	64,5°C	65,5°C	66,5°C	67,5°C	68,5°C

PCR: Taqman qPCR

Für die Taqman qPCR wurden von „Thermo Fisher scientific“ passende Sonden bestellt. Auch wurden andere Primer verwendet.

Tabelle 81: Versuchsbedingungen 1, Taqman PCR

Zusammensetzung	Volumen
LightCycler 480 Probes Master	10 µL
H ₂ O	8,4 µL
Primer forward (100pM/µL)	0,2 µL
Primer reverse (100pM/µL)	0,2 µL
PCR-Produkt der Gradient PCR	0,2 µL

Tabelle 82: Versuchsbedingungen 2, Taqman PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
1	95 °C	1 Min
2	95 °C	15 Sek
3	60 °C	30 Sek
4 Wiederhole ab Schritt 2	49x	
5	40 °C	10 Sek

Gelelektrophorese

PCR-Produkte wurden anschließend auf ein 6% PAAG-Gel aufgeladen. Zusammensetzung des Gels in Tabelle 44 verzeichnet.

Sequenzierung

Der Ablauf der Sequenzierung wurde in Kapitel 2.2.3 beschrieben.

2.2.13 Nachweis eines KO auf Proteinebene

Der nächste Abschnitt beschreibt die Homogenisierung in der Zellkultur gehaltener, adulter und neonataler Kardiomyozyten. Im weiteren Verlauf wurde mit den Proben ein Immunoblot durchgeführt.

Homogenisieren von Rattenherzen

Ausplatierte Zellen ventrikulärer neonataler oder adulter Kardiomyozyten wurden mit 1 mL 4°C kaltem PBS gespült und nach Zugabe von 60 µL Homogenisierungspuffer mit einem Zellscharber in 1.5 mL Tubes übertragen und auf Eis gestellt. Die Zellsuspension wurde 5-mal mit einer Insulinspritze aufgezogen und zentrifugiert (12.000 rpm, 4°C, 5 min). Das Supernatant wurde in neue Tubes übertragen und bei -20°C gelagert.

Proteinbestimmung

Für die Proteinquantifizierung der Proteinlysate wurde das Pierce BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific) verwendet. Die Proteinbestimmung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde in einem „FlexStation 3 plate reader“ photometrisch bestimmt (Molecular devices) und anhand der Soft Max Pro Software (Molecular devices) ausgewertet. Die Proben wurden mit Homogenisierungspuffer und SDS Stop 3x auf eine Zielmenge von 100 µL aufgefüllt, für 10 min bei 70°C aufgeköcht und anschließend bei -20°C eingefroren.

SDS polyacrylamid Gelelektrophorese und Immunoblot

In der SDS polyacrylamid Gelelektrophorese wurden die Proteine auf einer Membran nach ihrem Molekularem Gewicht aufgetrennt [175]. 8 - 10% Polyacrylamidgele (Tabelle 44) wurden am gleichen Tag angefertigt und in die Kammern wurde jeweils 20 µg Protein oder 3 µL Protein Marker V (PeqLab) eingeführt. Die Proben wurden in 1x SDS-Laufpuffer bei 100V für 20 min bis zum Trenngel eingelaufen und anschließend bei 130 V unter Raumtemperatur laufen gelassen. Nach 1:45 h wurde das Gel auf eine Nitrocellulosemembran für 2 h 100 V bei 4°C in 1 x Transferpuffer gebloftet. Nach dem Transfer wurden die Membranen für 5 Minuten in Ponceau S angefärbt und anschließend erst mit 1x TBS-Tween Puffer und dann in 3 – 5% Milchpuffer oder 3% BSA-Puffer für 30 Minuten gewaschen. Im Nachhinein wurden die primären Antikörper dazugegeben (Kapitel 2.1.7.1). Nach der Inkubation wurden die Membranen 3-mal für jeweils 10 Minuten mit 1x TBS-Tween Puffer gewaschen und der sekundäre Antikörper wurde dazugegeben (Kapitel 2.1.7.2). Nach der Inkubation wurden die Membranen wieder 3-mal für jeweils 10 Minuten mit 1x TBS-Tween Puffer gewaschen.

Entwicklung

Die Entwicklung wurde nach Anleitung des Herstellers mit dem SuperSignal West Pico PLUS kit (Thermo Fisher) auf Fuji Medical X-Ray Filmen im Konica SRX-101A Medical Film Processor (Konica Minolta) durchgeführt und die weitere Analyse fand mittels ImageJ statt.

2.2.14 FRET

Für die FRET-Messungen wurden adulte oder neonatale Kardiomyozyten auf 25 mm coverslips, die zuvor mit Laminin oder Gelatin gecoated wurden, ausgesät. Die Zellen wurden 1 Tag nach der Isolation mit den jeweiligen gRNS und Cas9 expressierenden Viren transduziert und 3, 4, 6 oder 14 Tage inkubiert. 1 Tag vor der Messung wurden die Zellen mit einem Epac-camps expressierenden Virus transduziert. Für die FRET-Messungen wurden die coverslips in FRET-Kammern (Attofluor microscopy chamber) überführt und in FRET-Puffer gehalten.

Die Bedingungen der FRET-Messungen sind von Sprenger, J.U. et. Al. beschrieben [176]. Ein invertiertes Nikon eclipse Ti-4 Mikroskop wurde verwendet. Das Donor Fluorophor (CFP) wurde in 10 Sekunden-Intervallen mittels einer CoolLED Licht emittierenden Diode angeregt, die eine einzelne Wellenlänge (440 nm) emittierte. Gleichzeitig wurden FRET-Emissionen durch einen beamsplitter (DV2, Photometrics) in CFP- und YFP-Signale getrennt. Die Donor und Akzeptor Emissionen wurden durch eine Kamera (complementary metal oxide semiconductor (CMOS) camera optiMOS, QImaging) detektiert, die mit der Diode synchronisiert wurde. Die Zellen wurden im FRET-Puffer gehalten (Tab. 58). Während der Messung, nachdem eine Baseline erreicht wurde, wurde den Zellen nacheinander ISO (10 nM für neonatale Kardiomyozyten; 100 µM für adulte Kardiomyozyten), selektive PDE2 (BAY - 100 µM) und PDE3 (Cilostamide - 10 µM) Inhibitoren und IBMX (100 µM) als nicht-selektiver PDE-Inhibitor zu pipettiert, um in den Zellen eine cAMP-Antwort hervorzurufen. Die Daten wurden mit der Micro Manager 1.4.5 Software gewonnen und Microsoft Excel analysiert. Da die Emmissionsspektren von CFP und YFP überlappen, wurde mithilfe der folgenden Formel ein „bleedthrough factor berechnet“, der für die Korrektur der Daten benutzt wurde:

$$FRET\ Ratio = \frac{(YFP - 0,9 * CFP)}{CFP}$$

Durch die Veränderungen der FRET Ratios gegen Zeit konnte in Echtzeit auf die cAMP-Menge in der Zelle gezogen werden.

2.2.15 Statistische Analyse

Die Auswertung der qPCR-Daten erfolgte mittels Delta-Delta-ct Methode. Die Auswertung der Immunoblots und FRET-Experimente erfolgte mittels „ImageJ“ und „Excel“. Die *p*-Werte wurden mit „mixed ANOVA“, „Sidak multiple comparison test“ und „Chi-squared test“ berechnet.

2.2.16 Expression der Isoformen

Tabelle 83: Gelelektrophorese zum Nachweis der Expression von PDE2A- und PDE3A-Isoformen in neonatalen Kardiomyozyten

Isoform	Primerkombination	PCR-Produkt
PDE2A tot (all forms)	PDE2A_totD1 + PDE2A_totR2	103 bp
PDE2A1	PDE2A_A1_D1 + PDE2A_A1_R1	141 bp
PDE2A1	PDE2A_A1_D2 + PDE2A_A1_R1	71 bp
PDE2A2	PDE2A_A2_D1 + PDE2A_A2_R1	45 bp
PDE2A2	PDE2A_A2_D1 + PDE2A_A2_R2	48 bp
PDE2A2	PDE2A_A2_D2 + PDE2A_A2_R1	49 bp
PDE2A2	PDE2A_A2_D2 + PDE2A_A2_R2	52 bp
PDE2A3	PDE2A_A3_D1 + PDE2A_A3_R1	116 bp
PDE2A3	PDE2A_A3_D1 + PDE2A_A3_R2	173 bp
PDE2A3	PDE2A_A3_D2 + PDE2A_A3_R1	66 bp
PDE2A3	PDE2A_A3_D2 + PDE2A_A3_R2	123 bp
PDE3A tot (all forms)	PDE3A_totD2 + PDE3A_totR2	118 bp
PDE3A1	PDE3A_A1_D1 + PDE3A_A1_R1	149 bp
PDE3A1	PDE3A_A1_D1 + PDE3A_A1_R2	
PDE3A1	PDE3A_A1_D2 + PDE3A_A1_R1	289 bp
PDE3A1	PDE3A_A1_D2 + PDE3A_A1_R2	167 bp
PDE3A2 + PDE3A3	PDE3A_A23_D1 + PDE3A_A23_R1	78 bp
PDE3A2 + PDE3A3	PDE3A_A23_D2 + PDE3A_A23_R1	95 bp

Tabelle 84: Kontrolle der Primer

Primerkombination	PCR-Produkt
PDE2A_A1_D1 + PDE2A_A1_D1int	101 bp
PDE2A_A1_D2 + PDE2A_A1_D2int	73 bp
PDE2A_A1_R1 + PDE2A_A1_R1int	83 bp
PDE2A_A3_D1 + PDE2A_A3_D1int	106 bp
PDE2A_A3_D2 + PDE2A_A3_D2int	180 bp
PDE2A_A3_R1 + PDE2A_A3_R1int	84 bp
PDE3A_A23_D1 + PDE3A_A23_D1int	111 bp
PDE3A_A23_D2 + PDE3A_A23_D2int	106 bp
PDE3A_A23_R1 + PDE3A_A23_R1int	54 bp

3 ERGEBNISSE

3.1 Expression der Isoformen

In den folgenden Versuchen sind wir der Frage nachgegangen, ob das CRISPR/Cas9 Geneditierungsverfahren für den KO der *Pde2a* und *Pde3a* Gene und deren spezifischer Isoformen in adulten und neonatalen Kardiomyozyten genutzt werden kann.

3.1.1 Expression von PDE2A- und PDE3A-Isoformen in neonatalen Kardiomyozyten

Zunächst ermittelten wir, welche der PDE2A und PDE3A Isoformen in Rattenkardiomyozyten exprimiert sind. Hierfür führten wir eine RT-PCR mit Isoform-spezifischen Primern aus der cDNS neonataler WT Ratten-KM durch und analysierten die PCR-Produkte auf 6% Agarose Gelen. Interessanterweise lieferten die Proben für PDE2A1, PDE2A3, PDE3A2 und PDE3A3 keine Banden der antizipierten Länge. Diese Beobachtungen legen nahe, dass lediglich PDE2A, PDE2A2, PDE3A und PDE3A1 in neonatalen Kardiomyozyten exprimiert werden. (Abbildung 12 A)

Zum Ausschluss des Vorliegens von gespleißten mRNS und geringer Spezifität der Primer, wurde eine gezieltere Analyse durchgeführt. Für jeden dieser Primer wurde jeweils ein im Intron liegender Primer synthetisiert. Eine weitere PCR wurde mit chromosomaler DNS neonataler WT Lysate durchgeführt und auf ein 6% PAAG-Gel aufgeladen (Abbildung 12 B). Die Gelelektrophorese lieferte Bands der erwarteten Länge und legt nahe, dass die Primer an die gewünschte Sequenz binden.

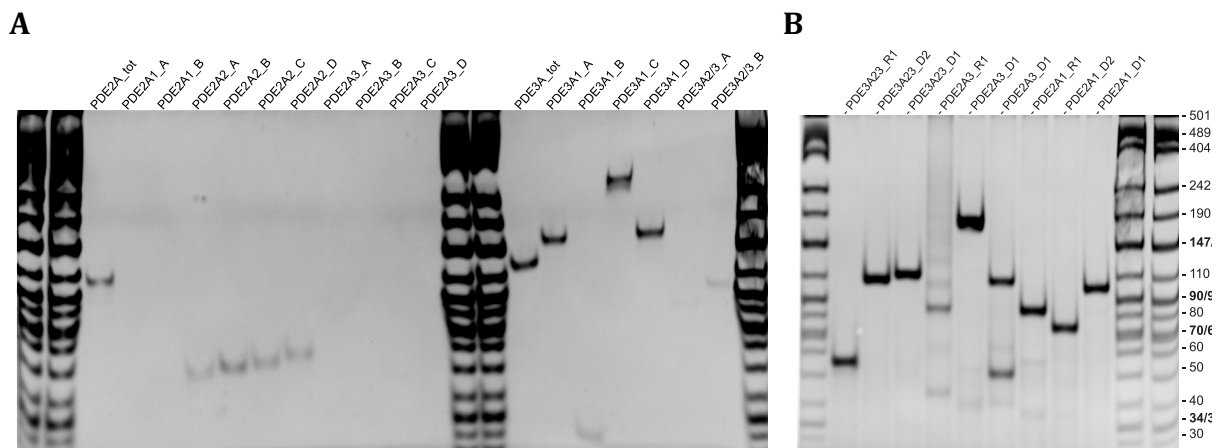


Abbildung 12: Gelelektrophorese zum Nachweis der Expression von PDE2A- und PDE3A-Isoformen in neonatalen Kardiomyozyten

Horizontal sind die PCR-Produkte aufgeladen (Die Namen der PCR-Produkte und korrelierende Primerkombination Tabelle 83). Vertikal ist die Länge in bp angegeben. **A.** Die RNS aus neonatalen Kardiomyozyten von WT-Ratten wurde isoliert und die PCR-Produkte auf ein 6% PAAG-Gel aufgeladen. **B.** Für jeden Primer, welcher in Versuch A kein PCR-Produkt ergeben hat, wurde ein im Intron liegender Primer synthetisiert. Die PCR-Produkte wurden auf ein 6% PAAG-Gel aufgeladen.

3.1.2 Expression von PDE2A- und PDE3A-Isoformen in adulten Kardiomyozyten

Zur Detektion der Expression von spezifischen PDE2A- und PDE3A-Isoformen in adulten KM wurde ebenfalls eine PCR mit Isoform-spezifischen Primern durchgeführt und die PCR-Produkte wurden auf ein 6% Gel aufgeladen. Hierfür wurde RNS aus adulten Zellen isoliert. Die Proben zum Nachweis von PDE3A2, PDE3A3 lieferten keine PCR-Produkte. Auch hier wurden die Primer nach dem gleichen Schema überprüft und es wurden PCR-Produkte der erwarteten Länge detektiert.

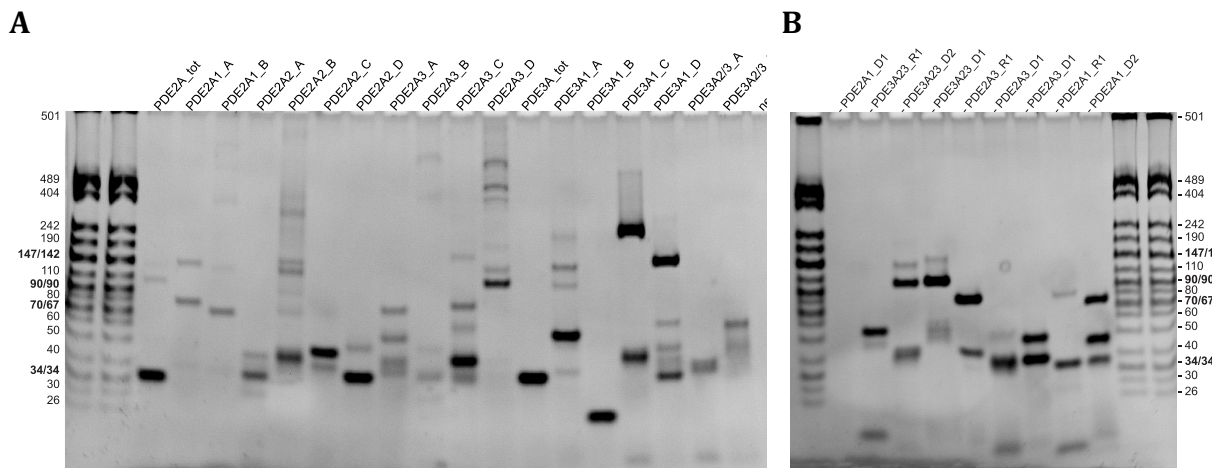


Abbildung 13: Gelelektrophorese zum Nachweis der Expression von PDE2A- und PDE3A-Isoformen in adulten Kardiomyozyten

Horizontal sind die PCR-Produkte aufgeladen (Die Namen der PCR-Produkte und korrelierende Primerkombination Tabelle 83). Vertikal ist die Länge in bp angegeben. Wir führten zunächst eine Touchdown PCR mit 14 Zyklen und anschließend eine reguläre PCR mit 35 Zyklen durch. Hierdurch kann die hohe Anzahl der unspezifischen Bands neben den spezifischen, dickeren Bands erläutert werden. **A.** Die RNS aus adulten Kardiomyozyten von WT-Ratten wurde isoliert und die PCR-Produkte auf ein 6% PAAG-Gel aufgeladen. **B.** Für jeden Primer, welcher in Versuch A kein PCR-Produkt ergeben hat, wurde ein im Intron liegender Primer synthetisiert. Die PCR-Produkte wurden auf ein 6% PAAG-Gel aufgeladen.

Diese Experimente legen nahe, dass die Primer auch für die Detektion der mRNA aus Lysaten adulter Kardiomyozyten geeignet sind. PDE2A, PDE2A1, PDE2A2, PDE2A3, PDE3A und PDE3A1 werden in adulten KM exprimiert. Eine Expression von PDE3A2 und PDE3A3 wurde dagegen nicht nachgewiesen.

3.2 gRNS design

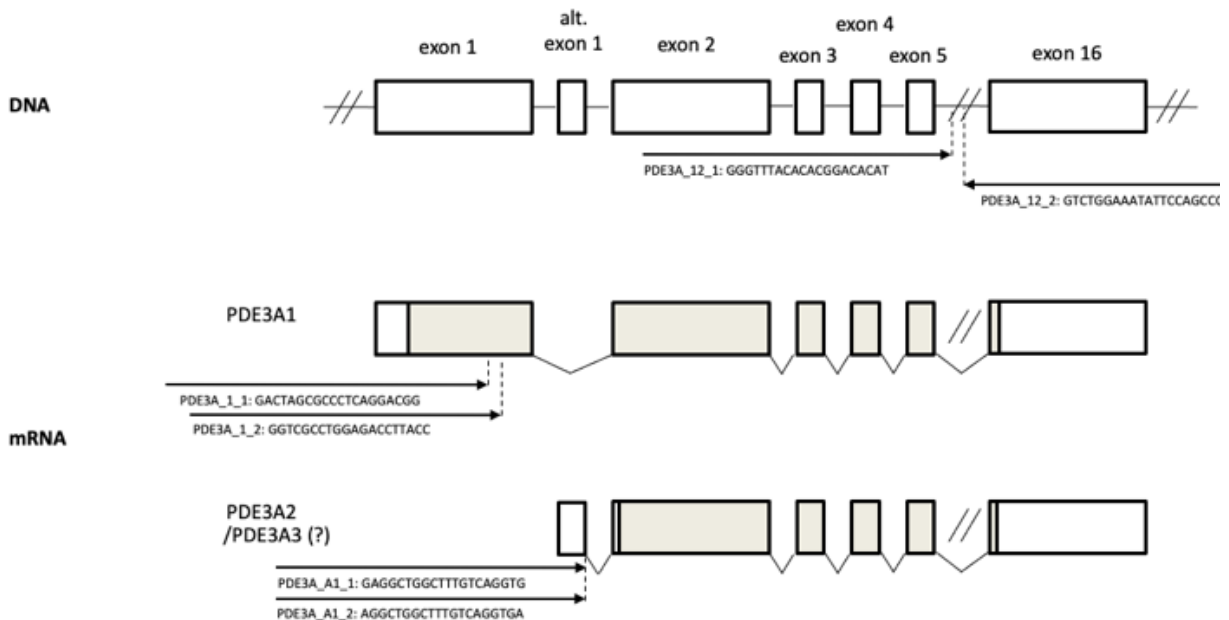
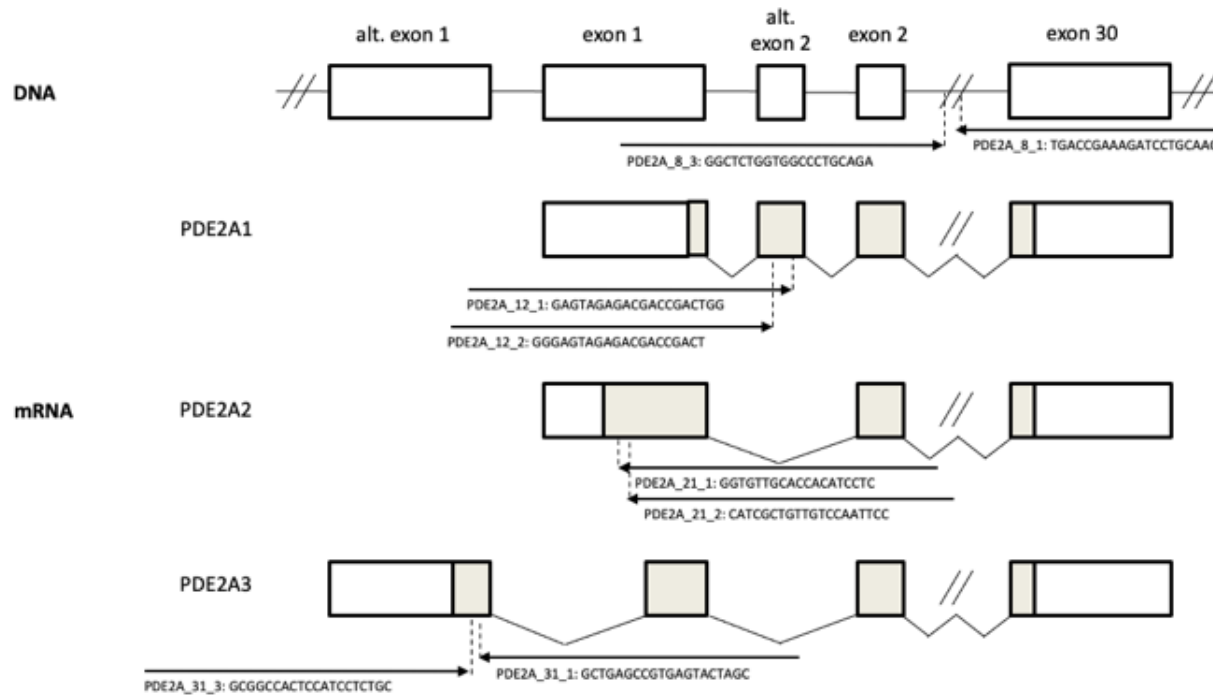
In dieser Arbeit beabsichtigten wir mittels des CRISPR/Cas9 Systems PDE2A und PDE3A gänzlich, oder deren individuelle Isoformen auszuschalten. Hierfür identifizierten wir zunächst

die PDE2A und PDE3A DNS- und RNS-Sequenz und anschließend deren spezifische gRNS-target-Sequenzen.

Die mRNA-Sequenzen der PDE2A Isoformen sind in NCBI charakterisiert: PDE2A1 - NM_001270604, PDE2A2 - NM_031079, PDE2A3 - NM_001143847. Für PDE3A sind 2 mRNAs charakterisiert: NM_017337, welche für PDE3A1 kodiert und XM_008763422 welche PDE3A2 kodiert. Für PDE3A3 ist keine mRNA charakterisiert. In humanen KM wurden 3 Isoformen mit unterschiedlichem molekularem Gewicht identifiziert: PDE3A-136, PDE3A-118, PDE3A-94. Wechsler et al. argumentieren, dass PDE3A-118 und PDE3A-94 beide von der mRNA PDE3A2 generiert werden [92]. Auf dieser Grundlage vermuten

wir einen ähnlichen Translationsmechanismus in Ratten-KM und gehen davon aus, dass die mRNS XM_008763422 PDE3A2 und PDE3A3 kodiert.

A



B

Abbildung 14: Schematische Darstellung des PDE2A und PDE3A Gens, deren mRNA und die einzelnen gRNS

Die weißen Balken stehen für den untranslatierten Bereich und die grauen Balken werden translatiert. Die waagerechten Pfeile stellen die gRNS dar. Auf jeder gRNS ist der jeweilige Name, die gRNS-target-Sequenz und deren Ausrichtung notiert.

A. Die gRNS PDE2A_8_1 und PDE2A_8_3 führen zusammen mit dem CRISPR/Cas9 Komplex zu einem Doppelstrangbruch im 8 Exon des PDE2A Gens. Dieses Exon ist in allen mRNA-Sequenzen enthalten und ein Doppelstrangbruch führt zum KO aller PDE2A Isoformen. Die mRNA PDE2A1 ist in NCBI als NM_001270604 charakterisiert. Die gRNS PDE2A_12_1 und PDE2A_12_2 führen zu einem Doppelstrangbruch im alternativen Exon 2 und sind spezifisch für den PDE2A1 KO.

Die mRNA PDE2A2 ist in NCBI als NM_031079 charakterisiert. Die gRNS PDE2A_21_1 und PDE2A_21_2 führen zu einem Doppelstrangbruch im upstream liegenden Fragment des Exons 1, welcher nur von der PDE2A2 Isoform translatiert wird. Der KO ist spezifisch für die PDE2A2 Isoform. Die mRNA PDE2A3 ist in NCBI als NM_001143847 charakterisiert. Die gRNS PDE2A_31_1 und PDE2A_31_3 führen zu einem Doppelstrangbruch im alternativen Exon 1 und sind spezifisch für den PDE2A3 KO.

B. Die gRNS PDE3A_12_1 und PDE3A_12_2 führen zusammen mit dem CRISPR/Cas9 Komplex zu einem Doppelstrangbruch im 12 Exon des PDE3A Gens. Dieses Exon ist in allen mRNA-Sequenzen enthalten und ein Doppelstrangbruch führt zum KO aller PDE3A Isoformen. Die mRNA PDE3A1 ist in NCBI als NM_017337 charakterisiert. Die gRNS PDE3A_1_1 und PDE3A_1_2 führen zu einem Doppelstrangbruch im Exon 1 und sind spezifisch für den PDE3A1 KO. Die mRNA PDE3A2 ist in NCBI als XM_008763422 charakterisiert. Die gRNS PDE3A_A1_1 und PDE3A_A1_2 führen zu einem Doppelstrangbruch im alternativen Exon 1, welche für die Promotorregion der mRNA PDE3A2 kodiert. Dies führt zu einem KO der PDE3A2 und PDE3A3 Isoform.

Auf Basis dieser Sequenzen entwarfen wir 15 gRNS, die zu einem vollständigen KO von PDE2A (PDE2A_8_3 and PDE2A_8_1) und PDE3A (PDE3A_12_1 and PDE3A_12_2) führen, oder lediglich zum KO spezifischer Isoformen (Tabelle 59)

3.3 Klonierung und Herstellung von Viren

Das gRNS/Cas9- Konstrukt wurde mittels adenoviraler Vektoren in die Zellen befördert. Die gRNS target Sequenzen wurden zunächst in das Plasmid pDNR221_U6gRNS und anschließend mittels LR-Rekombination in das Adenovirus expressierende pAD-Plasmid kloniert. Das Cas9 exprimierende Plasmid wurde uns von der „core facility transgenic animal and genetic engineering models“ (TRAM) der Medizinischen Fakultät Münster bereitgestellt.

3.3.1 Klonierung der gRNS in Plasmide pDNR221_U6gRNA

Die Klonierung der gRNS target Sequenz wurde im Kapitel 2.2.3 beschrieben. Die Proben wurden anschließend sequenziert und weisen die richtigen DNS-Sequenzen auf.

3.3.2 LR-Rekombination in den Virus expressierenden pAD-Vektor

Der Ablauf der LR-Rekombination wurde in Kapitel 2.2.4 beschrieben. Die Proben wurden anschließend mittels Restriktionsverdau und Gelelektrophorese analysiert.

A

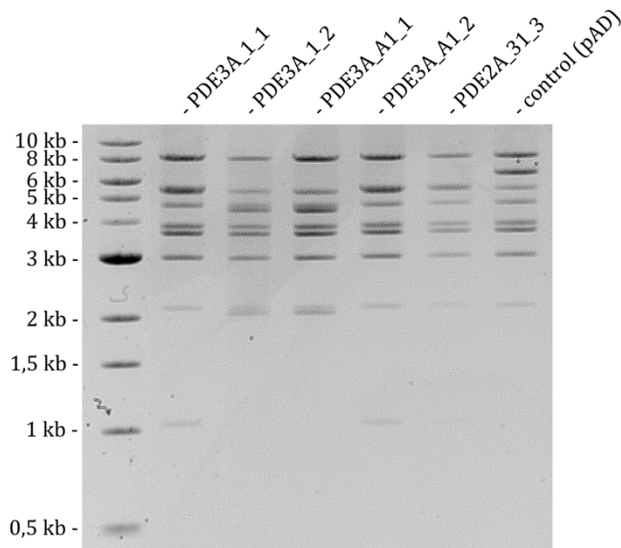


Abbildung 15: Restriktionsverdau und Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde auf einem 50 ml 3% Agarose Gel in TAE-Puffer 30 min laufen gelassen.

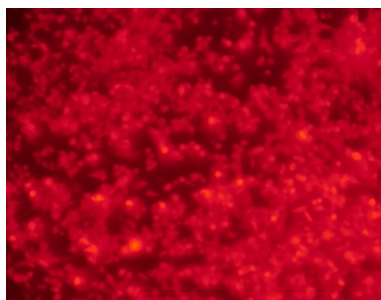
A. Die Proben wurden mit Hind III verdaut. Wir erwarten bei den Klonen Fragmente der Länge 8010, 5407, 5324, 4597, 3787, 3092, 2937, 2081, 994, 457, 75 bp. Bei der negativen Kontrolle (control (pAD)) erwarten wir Fragmente der Länge 8010, 6326, 5324, 4597, 3787, 3549, 2937, 2081, 75

Den positiven Klonen fehlt nach dem Restriktionsverdau das Fragment der Länge 6326 bp. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Klonierung erfolgreich war. Die Proben wurden anschließend sequenziert und weisen die richtigen DNS-Sequenzen auf.

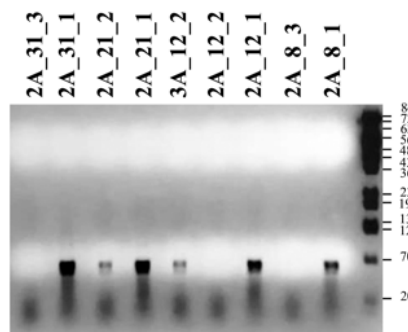
3.3.3 Kontrolle der Viren mittels Lyse, PCR, Gelelektrophorese und Sequenzierung

Nach der LR-Rekombination wurden die pAD-Plasmide in HEK293A Zellen transduziert und amplifiziert. Die positiven pAD-Klone beinhalten die Maroon expressierende Gensequenz und lassen die transduzierten Zellen rot fluoreszieren.

A



B



C

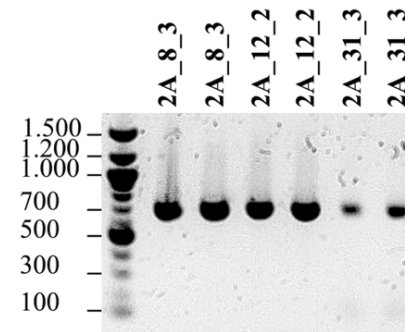


Abbildung 16: Gelelektrophorese und Fluoreszenzkontrolle

A. HEK293A Zellen nach Transduktion mit dem Adenovirus expressierenden Plasmid pAD PDE2A_8_3. **B.** Die Viren wurden lysiert. Die gRNS target Sequenz der einzelnen Klone wurde mittels gradient PCR und nested PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit 6x Ladepuffer in 0,8 % Agarose-Gel (in 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt) für 2 h bei 120 Volt in TAE-Puffer laufen gelassen. Die Länge der positiven Klone liegt bei 660 bp. Die Probe 2A_31_3, 2A_12_2 und 2A_8_3 weisen kein PCR-Produkt der Länge 660 bp auf. **C.** Die Probe 2A_31_3, 2A_12_2 und 2A_8_3 weisen ein PCR-Produkt der Länge 660 bp auf. Die Gelelektrophorese hatte die gleichen Bedingungen, wie in Versuch B.

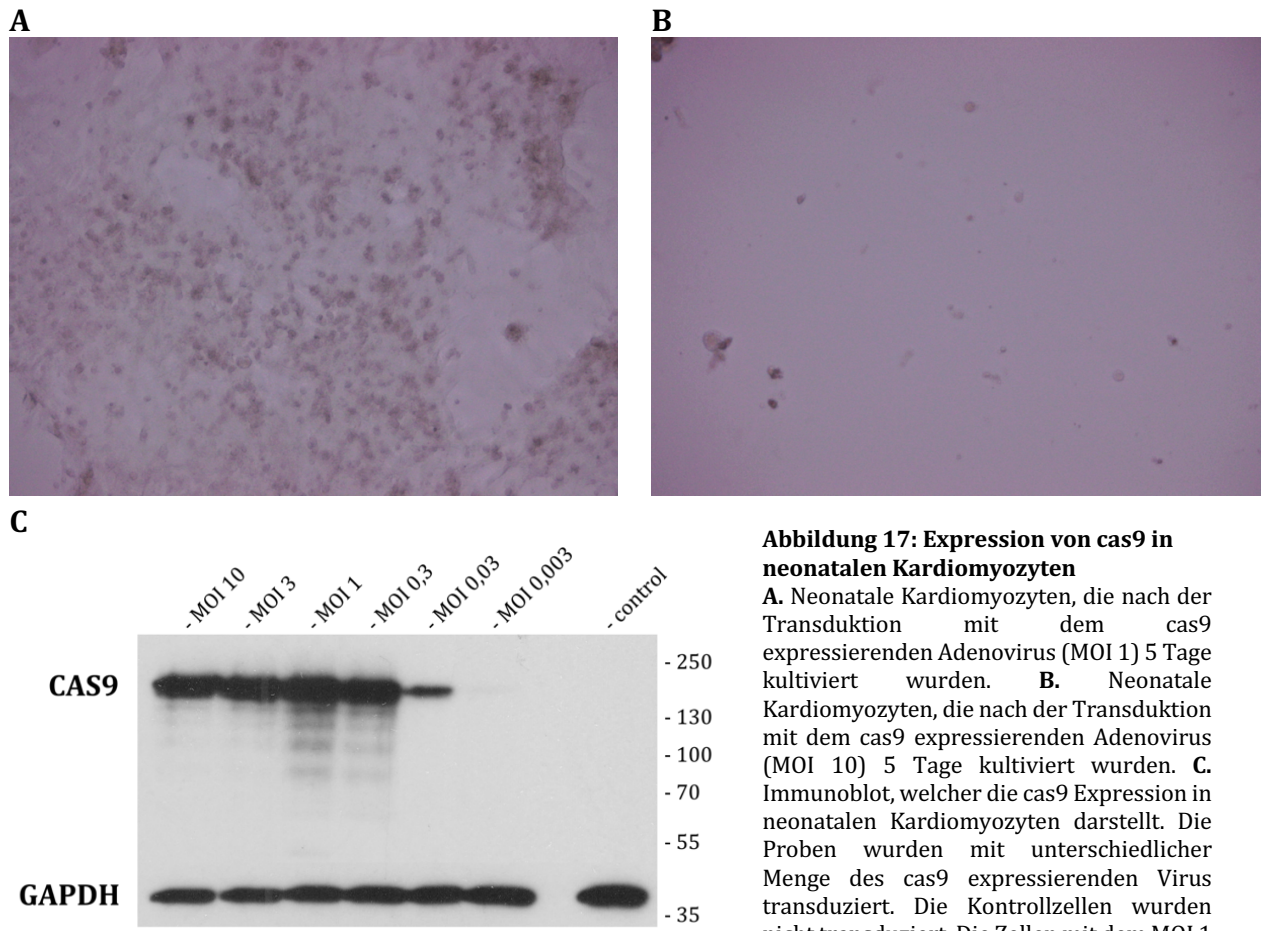
In Abbildung 16, A sind HEK293A Zellen dargestellt, die mit dem positiven Klon PDE2A_8_3 transduziert wurden und rot fluoreszieren. Dennoch weist dieser Klon nach der Amplifikation der gRNS target Sequenz mittels gradient PCR und nested PCR nicht das PCR-Produkt der antizipierten Länge auf (660 bp). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Adenovirus expressierenden pAD-Plasmide nach mehreren Amplifikationszyklen rekombinieren. Bis zu 33% der Klone weisen die gRNS target Sequenz nicht mehr auf und der Klon 2A_8_3 veranschaulicht, dass eine Fluoreszenzkontrolle nicht ausreichend ist, um eine Rekombination in der gRNS target Sequenz auszuschließen. Die weiteren Proben wurden mittels gradient PCR und nested PCR kontrolliert.

3.4 KO in neonatalen Kardiomyozyten

Primäre Zellen unterliegen nach längerer Kultivierung in Zellkulturen morphologischen und funktionellen Veränderungen [177]. Die Lebensdauer von primären Maus KM ist beträchtlich kürzer als die von primären adulten Rattenkardiomyozyten und weisen auch 1 Woche nach Isolation mehr morphologische Veränderungen auf [177-179]. Experimente mit neonatalen Kardiomyozyten sind auf bis zu 2 – 3 Wochen limitiert, bevor sie ihre Kontraktilität verlieren, was mit zytoskelettalen Veränderungen und Remodelling assoziiert ist [180]. Da die Experimente in dieser Arbeit eine längere Kultivierung der primären Zellen vorsehen, wurden diese an adulten und neonatalen KM durchgeführt.

3.4.1 Bestimmung der optimalen KO-Bedingungen

Für die Untersuchung der Effektivität der adenoviralen Konstrukte, wurden primäre KM mit unterschiedlichen Titern des Virus transduziert. Dafür wurden zunächst 1.000.000 primäre neonatale KM pro Well ausplatiert, mit dem cas9 expressierenden Adenovirus transduziert und 7 Tage in der Zellkultur kultiviert.



zeigen die größte Expression des cas9 Proteins.

6-Well Platten, die mit einer hohen Konzentration des cas9-exprimierenden Virus transduziert wurden (Abb. 17, B, MOI 10) wiesen signifikant weniger Zellen auf als die Platten, welche mit einer geringeren Konzentration transduziert wurden (Abb. 17, A, MOI 1). Dabei hatten hohe Konzentrationen von dem gRNS oder Biosensor exprimierenden Virus keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die cas9 Expression einen Einfluss auf das Überleben der Ratten-KM hat. Zusätzlich nahm die Zellqualität der KM mit höherer Konzentration ab. Die Morphologie der Zellen war verändert und eine geringere Anzahl der Zellen haben kontrahiert. Beides ist mit pathologischen Veränderungen in KM assoziiert. Aus diesem Grund bestimmten wir einen optimalen MOI, der gleichzeitig die kleinstmögliche Toxizität und den höchstmöglichen KO-Effekt bewirkt. Als nächstes wurde eine Titration des Virus durchgeführt und isolierte KM wurden mit einer unterschiedlichen Anzahl an Viren transduziert (MOI 0,003 – MOI 10). Ein Immunoblot dieser Zell Lysate zeigte die höchste Expression von cas9 bei einem MOI von 0,3 und 1 (Abb. 17, C). Für die weiteren Experimente wurde für den cas9 exprimierenden Virus ein MOI von 1 verwendet. Der MOI der gRNS war ein weiterer Parameter, der angepasst wurde. Hierauf wird im Kapitel 3.4.4 und 3.4.5 weiter eingegangen.

Somit wurden für die gezielte Analyse der Effektivität dieser Methode die optimalen Bedingungen für die Fluoreszenzmessung, qPCR, PCR-Sequenzierung, Westernblot und FRET-Experimente ermittelt (Abb.11).

3.4.2 Fluoreszenzkontrolle

Die gRNS expressierenden Plasmide beinhalten Maroon expressierende Gensequenz und lassen die transduzierten Zellen rot fluoreszieren. Bei der Klonierung wurde dies für die Selektion positiver Klone verwendet (Kapitel 3.3). Für die weiteren Experimente wurde dies für den Nachweis einer erfolgreichen Transduktion und die Bestimmung eines optimalen MOI verwendet.

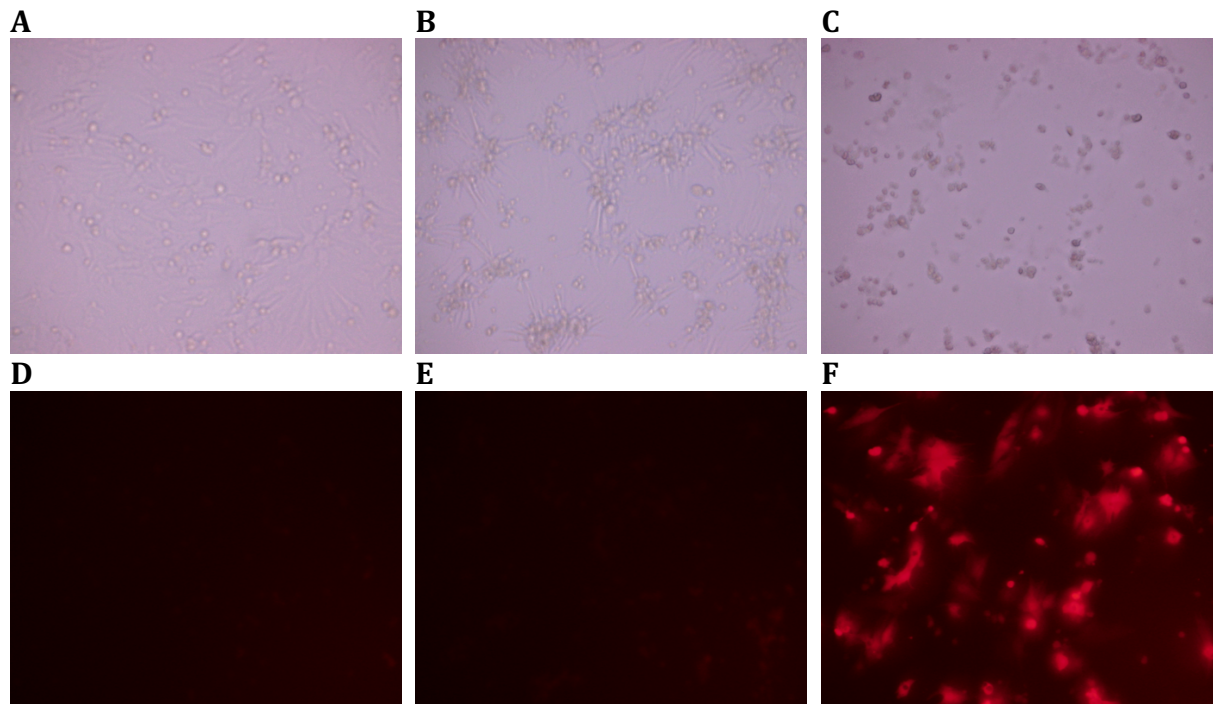


Abbildung 18: Fluoreszenzkontrolle

Primäre Kardiomyozyten von WT 24-48 h alten Ratten wurden 48 h nach Isolation nicht transduziert (**A, D**), oder mit dem Virus „cas9“ transduziert (MOI: 1) (**B, E**), über einen Zeitraum von 3 Tagen inkubiert bzw. dienten der negativen Kontrolle (ohne Zugabe der gRNS expressierenden Viren). Es wurde ein KO-Effekt erzielt, wenn sie zusätzlich mit den gRNS expressierenden Viren transduziert wurden (MOI: 3) (**C, F**). Anschließend wurden die Zellen auf Fluoreszenz untersucht.

3.4.3 Kontrolle des KO auf RNS-Ebene

Da mRNS eine geringere Halbwertszeit als Proteine hat, erwarteten wir das Erliegen der mRNS-Menge bereits 3 Tage nach Transduktion und führten (RT)-qPCR nach dem in Abbildung 11 beschriebenen Schema durch.

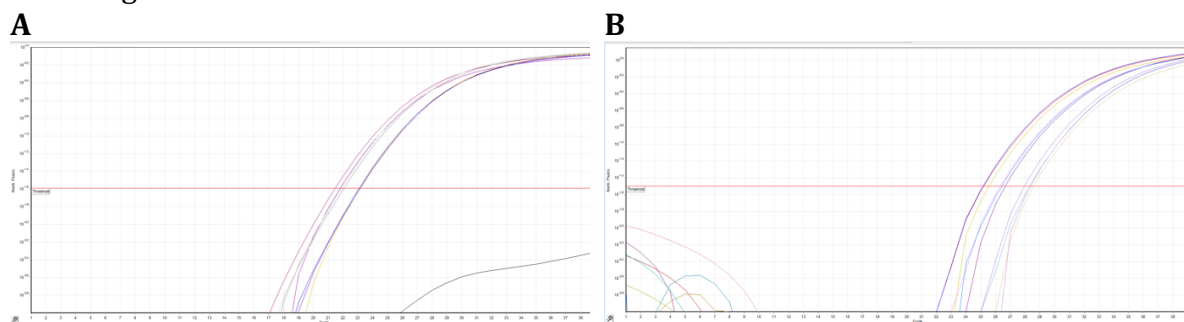


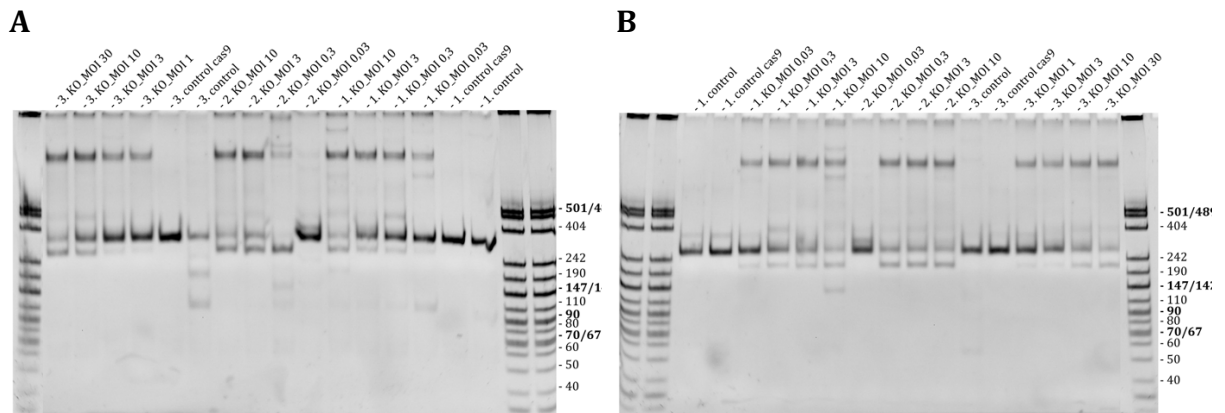
Abbildung 19: qPCR

Primäre Kardiomyozyten von WT 24-48 h alten Ratten wurden 48 h nach Isolation mit dem Virus „cas9“ transduziert, über einen Zeitraum von 3 Tagen inkubiert bzw. dienten der negativen Kontrolle (ohne Zugabe der gRNS expressierenden Viren). Es wurde ein KO-Effekt erzielt, wenn sie zusätzlich mit den gRNS expressierenden Viren PDE2A_8_1, PDE2A_8_3 (A) oder PDE3A_12_1, PDE3A_12_2 (B) transduziert wurden. Anschließend wurde die RNS isoliert, mRNS in cDNS umgeschrieben und mittels RT-qPCR quantifiziert. Die Normalisierung der Daten erfolgte gegen GAPDH. Die relativen PDE2A-KO- und PDE3A-KO- Werte wurden prozentual zur Kontrolle in Relation gesetzt. Die Datenpunkte der Kontrolle wurden dabei auf 100 % gesetzt. Die Auswertung der qPCR-Daten erfolgte mittels Delta-Delta-ct Methode. A. Dargestellt sind untransduzierte Kontrollen, cas9-Kontrollen (Transduziert mit cas9-Virus MOI 1) und PDE2A-KO Proben (Transduziert mit cas9-Virus MOI 1 und PDE2A_8_1, PDE2A_8_3 MOI 0,5). B. Dargestellt sind untransduzierte Kontrollen, cas9-Kontrollen (Transduziert mit cas9-Virus MOI 1) und PDE2A-KO Proben (Transduziert mit cas9-Virus MOI 1 und PDE3A_12_1, PDE3A_12_2 MOI 0,5).

Wie Abbildung 20 darstellt, führt dies zur signifikanten Verminderung der PDE2A von $81 \pm 2\%$ (Mittelwert $\pm$ s.e.m., $n = 3$) und PDE3A $43 \pm 8\%$ (Mittelwert $\pm$ s.e.m., $n = 3$) expressierenden mRNS-Menge. Wir führten die stärkere Verringerung der PDE2A mRNS auf eine möglicherweise geringere Halbwertszeit zurück.

3.4.4 Kontrolle des KO auf Ebene der chromosomalen DNS

Zum Nachweis des KO auf Ebene der DNS wurden neonatale KM aus 4 verschiedenen Isolationen mit unterschiedlichen MOI transduziert. Nach dem im Kapitel 2.2.12 beschriebenen Verlauf wurden die DNS-Sequenz im PDE2A und PDE3A Gen, welche durch de CRISPR/Cas9 Komplex zerschnitten werden, mittels Taqman-qPCR, Gelelektrophorese und Sequenzierung analysiert.



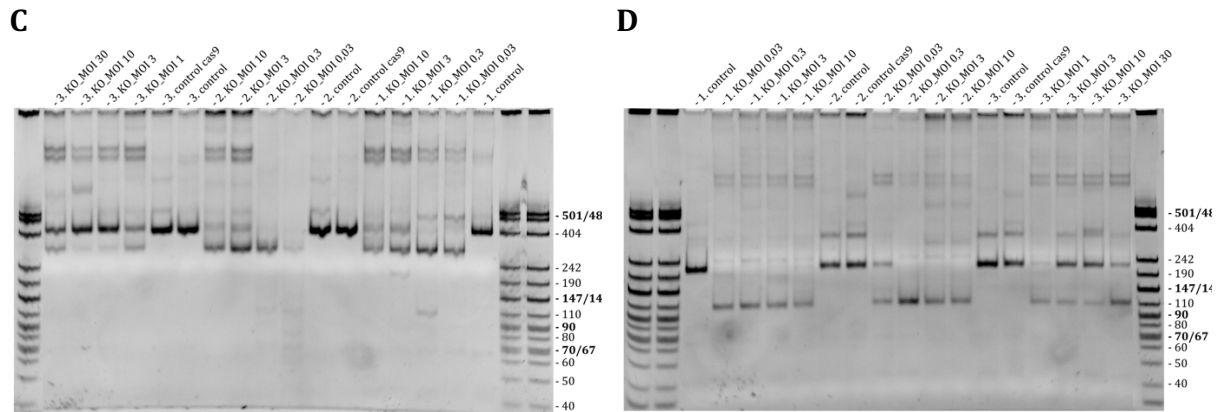


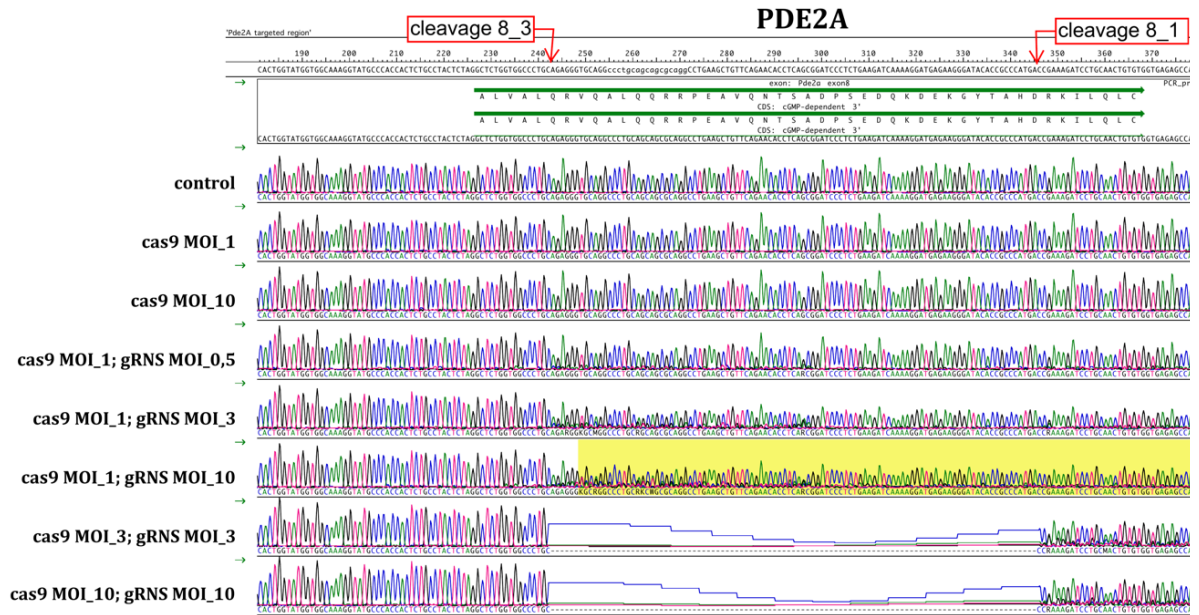
Abbildung 20: Gelelektrophorese der chromosomalen DNS von PDE2A und PDE3A aus Zelllysaten neonataler Kardiomyozyten

Primäre Kardiomyozyten von WT 24-48 h alten Ratten wurden 48 h nach Isolation nicht transduziert (1. control, 2. Control, 3. control), oder mit dem Virus „cas9“ transduziert (3. control cas9, 2. control cas9), über einen Zeitraum von 14 Tagen inkubiert bzw. dienten der negativen Kontrolle (ohne Zugabe der gRNS expressierenden Viren). Es wurde ein KO-Effekt erzielt, wenn sie zusätzlich mit den gRNS expressierenden Viren PDE2A_8_1, PDE2A_8_3 (**A, B**) oder PDE3A_12_1, PDE3A_12_2 (**C, D**) transduziert wurden. Anschließend wurde die DNS isoliert, mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Das MOI des cas9 expressierenden Virus war 1 und das MOI der gRNS expressierenden Viren war variabel (MOI 0,03 – MOI 30). Die PCR-Produkte wurden zusätzlich auf eine 6% Agarose-Gelelektrophorese geladen. Es sind PCR-Produkte von Proben aus 3 verschiedenen Isolationen dargestellt. Die unterschiedlichen Isolationen sind durch eine Zahl vor der Probe veranschaulicht (1., 2., 3.).

A. Die PCR amplifizierte einen Abschnitt des 12 Exons des PDE3A Gens. Das Wildtyp DNS-Fragment hat eine voraussichtliche Länge von 308 bp. Folgende Primer wurden verwendet: Pde3A_int11d1b, Pde3A_int12r3. **B.** Es wurden die gleichen Proben wie in Abbildung A verwendet. Die PCR amplifizierte einen Abschnitt des 12 Exons des PDE3A Gens. Das Wildtyp DNS-Fragment hat eine voraussichtliche Länge von 256 bp. Folgende Primer wurden verwendet: Pde3A_int11d2b, Pde3A_int12r3. **C.** Die PCR amplifizierte einen Abschnitt des 8 Exons des PDE2A Gens. Das Wildtyp DNS-Fragment hat eine voraussichtliche Länge von 399 bp. Folgende Primer wurden verwendet: Pde2A_int7d1b, Pde2A_int8r3. **D.** Es wurden die gleichen Proben wie in Abbildung C verwendet. Die PCR amplifizierte einen Abschnitt des 8 Exons des PDE2A Gens. Das Wildtyp DNS-Fragment hat eine voraussichtliche Länge von 203 bp. Folgende Primer wurden verwendet: Pde2A_int7d3, Pde2A_int8r3.

Die Kontrollen, welche nur mit dem cas9 exprimierenden Virus oder nicht transduziert wurden, weisen DNS-Fragmente der vorausgesagten Länge auf. Die Proben weisen längere und kürzere PCR-Produkte auf. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die DNS-Sequenz durch den CRISPR/Cas9 Komplex erfolgreich zerschnitten wurden. Durch den Doppelstrangbruch weisen die Proben PCR-Produkte unterschiedlicher Länge auf (Abb. 20).

G



H



Abbildung 21: Sequenz der chromosomalen DNS von PDE2A und PDE3A aus Zelllysaten neonataler KO KM

Die roten Pfeile stellen den Schnitt des CRISPR/Cas9 Komplexes dar.

G. Sequenz von Exon 8. Proben, welche mit dem Virus cas9, gRNA PDE2A_8_1 und PDE2A_8_3 transduziert wurden. **H.** Sequenz von Exon 12. Proben, welche mit dem Virus cas9, PDE3A_12_1 und PDE3A_12_2 transduziert wurden.

Zuletzt wurden die Proben sequenziert. Aus Abbildung 21 G und F ist zu entnehmen, dass bereits bei einem niedrigen MOI der gRNA expressierenden Viren (cas9 MOI_1; gRNA MOI_0,5) die Gipfel der Sequenzen im Vergleich zu den Kontrollen flacher sind. Auch sind Gipfel anderer Nukleotide dargestellt. Je höher der MOI, desto höher werden die Gipfel der anderen Nukleotide. Da die PCR-Produkte und Sequenzen ein Produkt der DNS-Sequenzen tausender von Zellen sind, sprechen kleinere Gipfel anderer Nukleotide bereits von einem KO des Gens. Folglich reichen geringe MOI aus, um einen KO hervorzurufen. Beim höheren MOI des cas9 expressierenden Virus kommt es zur Deletion des gesamten Lokus. Die

Ergebnisse sind sowohl für den KO von PDE2A als auch für PDE3A erfolgreich reproduziert worden.

3.4.5 Kontrolle des KO auf Proteinebene

Zum Nachweis des KO auf Ebene der Proteine wurden neonatale KM nach dem Schema in Abbildung 11 isoliert, transduziert und kultiviert. Der Ablauf des Immunoblots ist in Kapitel 2.2.13 beschrieben.

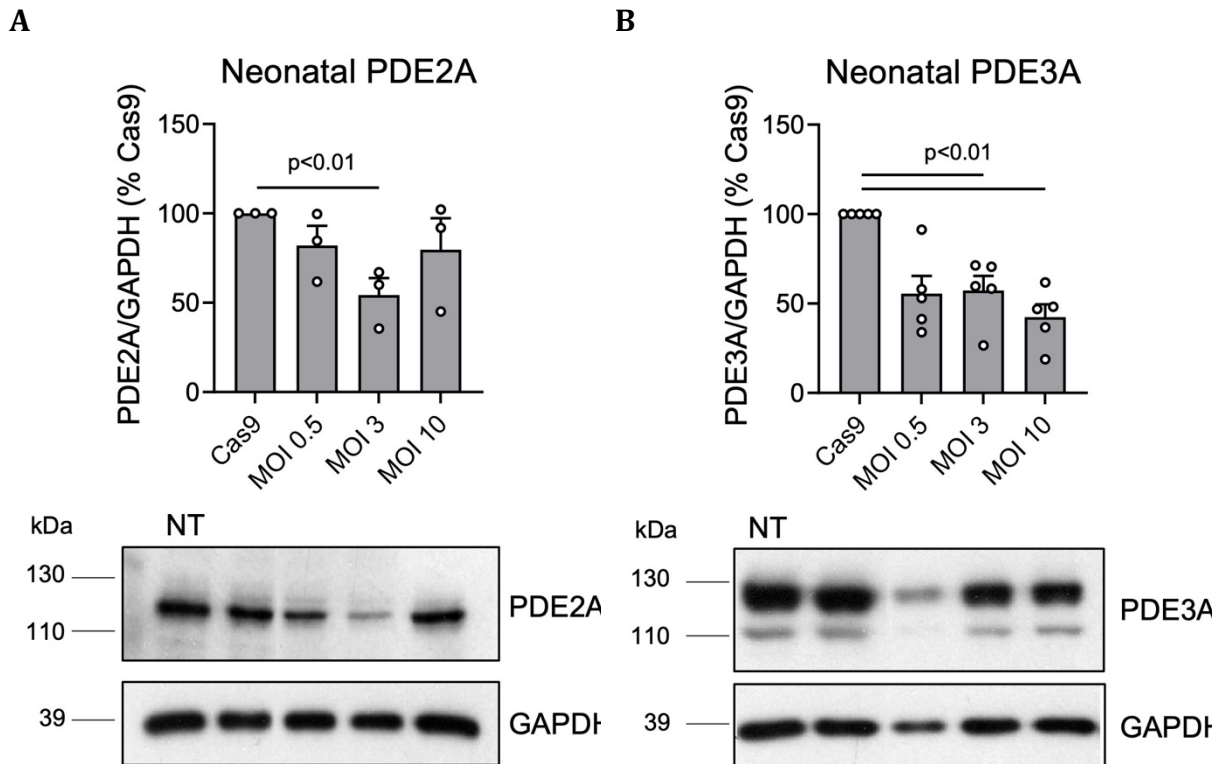


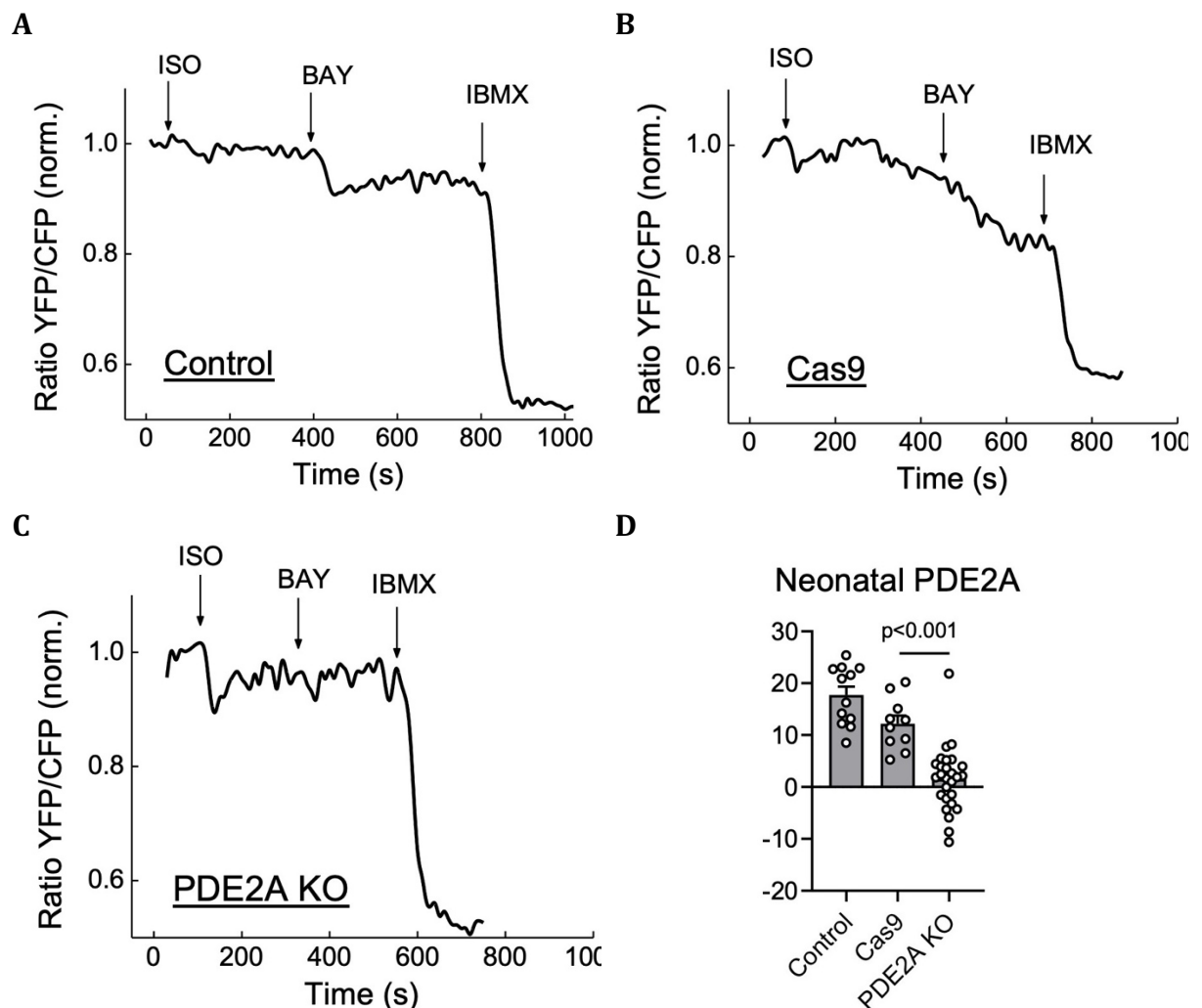
Abbildung 22: Immunoblot von PDE2A und PDE3A aus Zelllysaten neonataler Kardiomyozyten

Primäre KM von WT 24-48 h alten Ratten wurden 48 h nach Isolation nicht transduziert (NT), oder mit dem Virus „cas9“ transduziert (MOI 1) (Cas9) und dienten der negativen Kontrolle (ohne Zugabe der gRNS exprimierenden Viren). Es wurde ein KO-Effekt erzielt, wenn sie zusätzlich mit den gRNS exprimierenden Viren (MOI 0,5; 3; 10) PDE2A_8_1, PDE2A_8_3 (A) oder PDE3A_12_1, PDE3A_12_2 (B) transduziert wurden. Anschließend wurden die Zellen, homogenisiert und die Proteine im Immunoblot aufgetrennt. Die Normalisierung der Daten erfolgte gegen GAPDH. Die relativen PDE2A-KO- und PDE3A-KO- Werte wurden prozentual zur cas9-Kontrolle in Relation gesetzt. Die Datenpunkte der Kontrolle wurden auf 100 % gesetzt. Die Auswertung der Immunoblots erfolgte mittels „ImageJ“ und „Excel“. Die *p*-Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und „Sidak multiple comparison test“ berechnet. **A.** Statistische Analyse von Immunoblots des PDE2A-KO aus drei Isolationen. MOI 0,5: $\bar{x} = 82,1\%$, $p = 0,58$; MOI 3: $\bar{x} = 54,3\%$, $p = 0,03$; MOI 10: $\bar{x} = 79,7\%$, $p = 0,49$. Repräsentativer Immunoblot eines PDE2A-KO. **B.** Statistische Analyse von Immunoblots des PDE3A-KO aus fünf Isolationen. MOI 0,5: $\bar{x} = 55,5\%$, $p = 0,006$; MOI 3: $\bar{x} = 57,3\%$, $p = 0,008$; MOI 10: $\bar{x} = 42,5\%$, $p = 0,001$. Repräsentativer Immunoblot eines PDE3A-KO. Der Band mit der MOI 0,5-Probe wirkt schwächer, da es mit weniger Protein beladen wurde (Dargestellt mittels GAPDH-Kontrolle)

Die Immunoblots zeigen zwar eine starke Reduktion in der Proteinexpression von 46% im Falle von PDE2A (MOI 3) und 58 % im Falle von PDE3A (MOI 10), jedoch keinen vollständigen KO des Proteins. Wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben, sind mögliche Gründe hierfür eine unvollständige Transduktion der KM oder weitere Proliferation bestimmter Zellen auch nach Transduktion. Eine weitere Erklärung hierfür könnte eine ungleichmäßige Verteilung der Viren sein.

3.4.6 Kontrolle auf funktioneller Ebene (FRET)

Zur Beurteilung des KO-Effektes auf funktioneller Ebene wurden intrazelluläre cAMP-Konzentrationen nach beta-adrenergen Stimulation mittels FRET-Experimente bestimmt. Die Versuchsbedingungen sind in Abbildung 11 dargestellt. 3 Tage vor den Messungen wurden die Zellen zusätzlich mit Epac1-camps Sensor transduziert. Dieser ist nicht an eine Membran gebunden, liegt im Zytosol vor und gibt uns Aufschluss über die second messenger Konzentration in der gesamten Zelle. Während des FRET-Experiments findet alle 5 Sekunden eine Stimulation des Donor Fluorophores (CFP) und eine gleichzeitige Messung der Donor- und Akzeptoremissionen (YFP) statt. Mittels dieser Werte lässt sich das „FRET Ratio“ berechnen. Im zweiten Schritt können wir auf die Echtzeit-cAMP-Menge in der KM schließen (Kapitel 2.2.14). Den KM werden zunächst Isoprenalin (Aktivator der AC), danach ein selektiver PDE-Inhibitor BAY (PDE2 Inhibitor) oder Cilostamid (PDE3 Inhibitor) und abschließend ein unselektiver Inhibitor aller Phosphodiesterasen (IBMX) zugegeben.



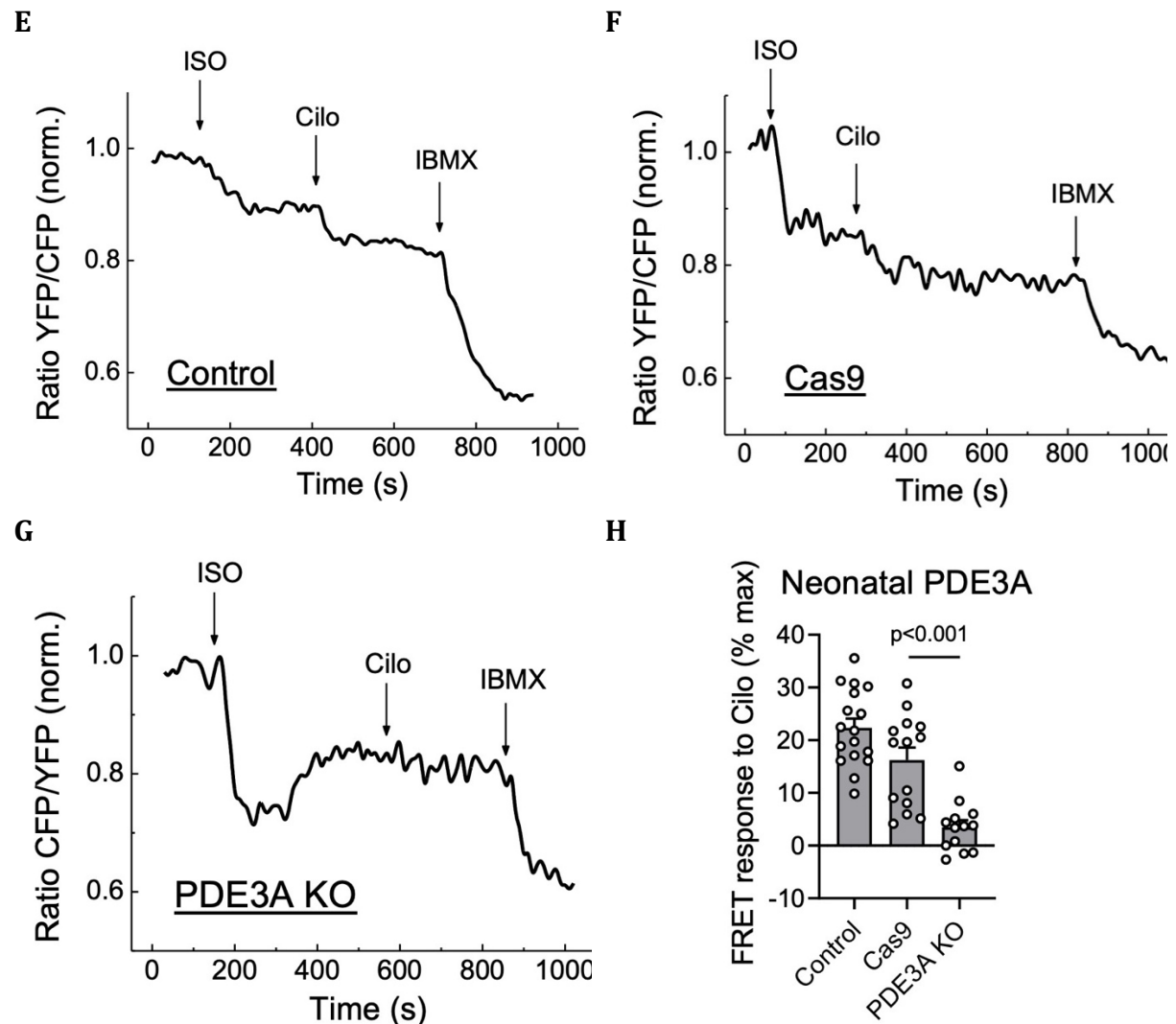


Abbildung 23: FRET neonataler KM

Primäre Kardiomyozyten von WT 24-48 h alten Ratten wurden 48 h nach Isolation nicht transduziert (Control), oder mit Cas9 transduziert (Cas9), über einen Zeitraum von 14 Tagen (Abbildung 11) inkubiert bzw. dienten der negativen Kontrolle. Ein KO-Effekt wurde erzielt bei gleichzeitiger Transduktion mit PDE2A_8_1, PDE2A_8_3 (PDE2A KO) oder PDE3A_12_1, PDE3A_12_2 (PDE3A KO). Anschließend wurden FRET-Experimente durchgeführt. Die Kardiomyozyten wurden mit ISO (10 nM), BAY (100 nM) oder Cilo (10 μ M) und IBMX (100 μ M) stimuliert. Der Zeitpunkt der Probenapplikation wird mit einem Pfeil dargestellt. Die Applikation fand statt, nachdem eine „Baseline“ erreicht wurde. Das YFP/CFP-Verhältnis wurde bestimmt. Dieser ist inverse proportional der intrazellulären cAMP Konzentration. Die Auswertung der Immunoblots erfolgte mittels „ImageJ“ und „Excel“. Die p -Werte wurden mit „mixed ANOVA“ und „Chi-squared test“ berechnet. **A. + E.** Repräsentativer FRET-Trace einer untransduzierten Zelle. **B. + F.** Repräsentativer FRET-Trace einer mit cas9 (MOI 1) transduzierten Zelle. **C.** Repräsentativer FRET-Trace einer mit cas9 (MOI 1), PDE2A_8_1 und PDE2A_8_3 (MOI 3) transduzierten Zelle. **G.** Repräsentativer FRET-Trace einer mit cas9 (MOI 1), PDE3A_12_1 und PDE3A_12_2 (MOI 3) transduzierten Zelle. **D.** Statistische Analyse PDE2A-KO FRET-Experimente; control: $\bar{x} = 22,37\%$, Cas9: $\bar{x} = 12,19\%$; PDE2A KO: $\bar{x} = 1,53\%$, $p < 0.001$. **H.** Statistische Analyse PDE2A-KO FRET-Experimente; control: $\bar{x} = 22,35\%$, Cas9: $\bar{x} = 16,24\%$; PDE2A KO: $\bar{x} = 3,48\%$, $p < 0.001$

Wie erwartet nahm in den Kontroll-Zellen die cAMP-Konzentration sowohl nach Stimulation mit Isoprenalin und IBMX als auch nach Zugabe der selektiven PDE-Inhibitoren (BAY, Cilostamide) zu.

Die PDE2A- und PDE3A KO-Zellen zeigen alle eine stark verminderte oder vollkommen aufgehobene Antwort nach Zugabe von BAY (Abbildung 24, C) oder Cilostamide (Abbildung 24, G). Diese Ergebnisse legen einen erfolgreichen KO von PDE2A und PDE3A auf funktioneller Ebene nahe. Lediglich mit Cas9 transduzierte Zellen wiesen ebenfalls verglichen mit den untransduzierten Wildtypzellen eine verminderte Antwort auf BAY

und Cilostamide auf. Dies ist durch eine Interaktion mit Adenoviren erklärbar und die gemessenen Unterschiede wiesen keine statistische Signifikanz auf.

3.5 KO in adulten Kardiomyozyten

Nach erfolgreichen Ergebnissen mit neonatalen KM strebten wir die Etablierung dieser Methode in adulten KM an. Dies stellte eine größere Herausforderung dar, da die Lebensdauer von primären adulten Ratten-KM beträchtlich kürzer als die von primären neonatalen Ratten-KM ist.

3.5.1 Bestimmung der optimalen Bedingungen für KO

Auch für Experimente mit adulten Ratten-KM mussten optimale Bedingungen geschaffen werden. Dafür wurden zunächst 10.000 primäre neonatale KM pro Well ausplattiert, mit dem cas9 expressierenden Adenovirus transduziert und 3 Tage in der Zellkultur kultiviert. 6-Well Platten, die mit höheren Konzentrationen des cas9-expressierenden Virus transduziert wurden wiesen auch hier signifikant weniger Zellen auf. Diese Beobachtungen legen weiterhin nahe, dass cas9 eine toxische Wirkung auf das Überleben von Zellen in Zellkulturen aufweist. Zusätzlich nahm die Zellqualität der transduzierten adulten Kardiomyozyten ab. Auch hier wurde die MOI mit der kleinstmöglichen Toxizität und dem höchstmöglichen KO-Effekt bestimmt.

Als nächstes wurde eine Titration des Virus durchgeführt und isolierte KM wurden mit einer unterschiedlichen Anzahl an Virus transduziert (MOI 30 – MOI 22.000). Ein Immunoblot dieser Zellen zeigte eine hohe Expression von cas9 bei einem MOI von 300 und für die weiteren Experimente wurde dieser MOI verwendet (Abb. 25, A). Zusätzlich stellten wir da, dass cas9 auch nach Transduktion mit den gRNS expressierenden Adenoviren weiterhin exprimiert wird (Abb. 25, B).

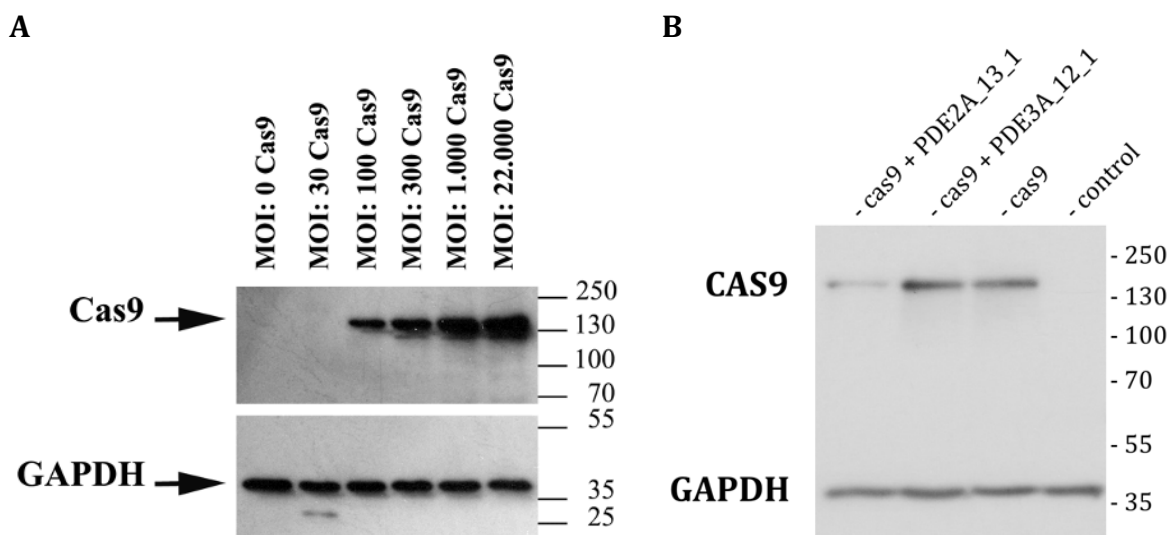


Abbildung 24: Immunoblot von Cas9 aus Zelllysaten adulter KM

Primäre KM aus adulten WT-Ratten wurden unmittelbar nach Isolation transduziert und über einen Zeitraum von 3 Tagen inkubiert. Untransduzierte Zellen dienten der negativen Kontrolle. Anschließend wurden die Zellen, homogenisiert und die Proteine im Immunoblot aufgetrennt. Die Normalisierung der Daten erfolgte gegen GAPDH. Die Auswertung der Immunoblots erfolgte mittels „ImageJ“ und „Excel. A. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen MOIs

des cas9 Virus transduziert (MOI 30 – 22000). **B.** Die Zellen wurden mit dem cas9 Virus transduziert (MOI 300), oder zusätzlich mit den gRNS expressierenden Viren PDE2A_13_1 (cas9 – PDE2A_13_1) (MOI 300) und PDE3A_12_1 (cas9 + PDE3A_12_1) (MOI 300) transduziert.

3.5.2 Kontrolle des KO auf Proteinebene

Zum Nachweis des KO auf Ebene der Proteine wurden adulte Kardiomyozyten nach dem Schema in Abbildung 25 isoliert, transduziert und kultiviert.

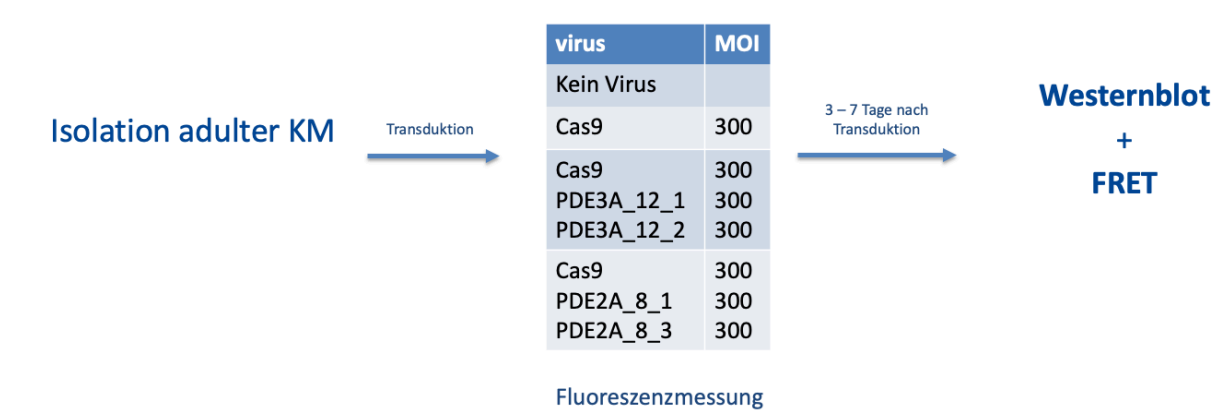
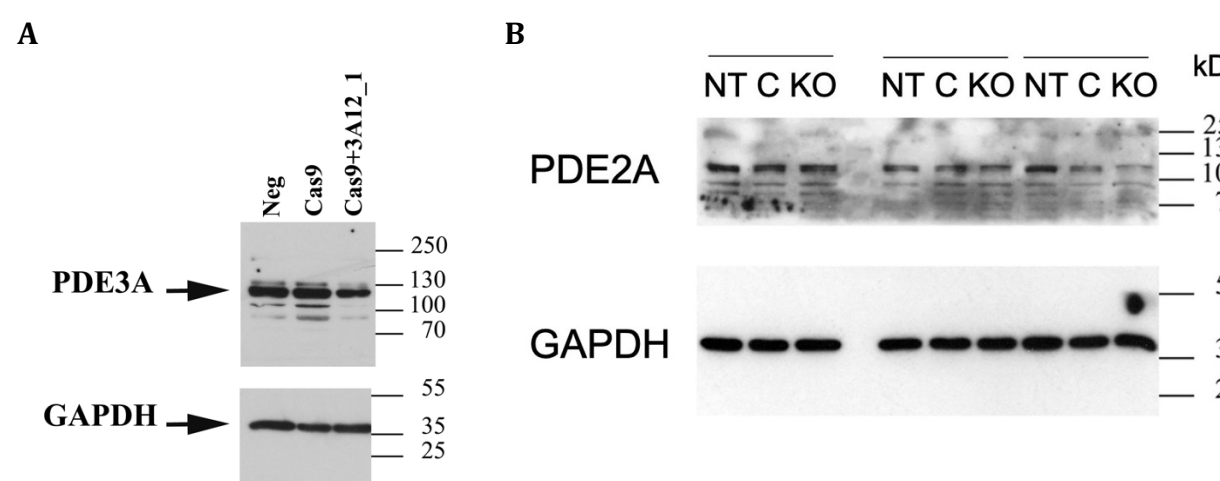


Abbildung 25: Experimenteller Ablauf am Beispiel des PDE3A-KO in adulten Kardiomyozyten
Beispielhafte Darstellung des experimentellen Ablaufs nach Isolation von Kardiomyozyten. Die Zellen wurde am gleichen Tag der Isolation transduziert. den KO wurde sowohl der Cas9 expressierende Virus als auch gRNS expressierende Viren mit unterschiedlichen MOIs verabreicht. Mit den Zellen erfolgten Westernblots oder FRET-Experimente.

Der Ablauf des Immunoblots ist in Kapitel 2.2.13 beschrieben. Bereits 3 Tage nach Transduktion ist ein Effekt des KO zu verzeichnen. Doch 6 Tage nach Transduktion kommt es nahezu zum vollständigen Erliegen der Proteinexpression.



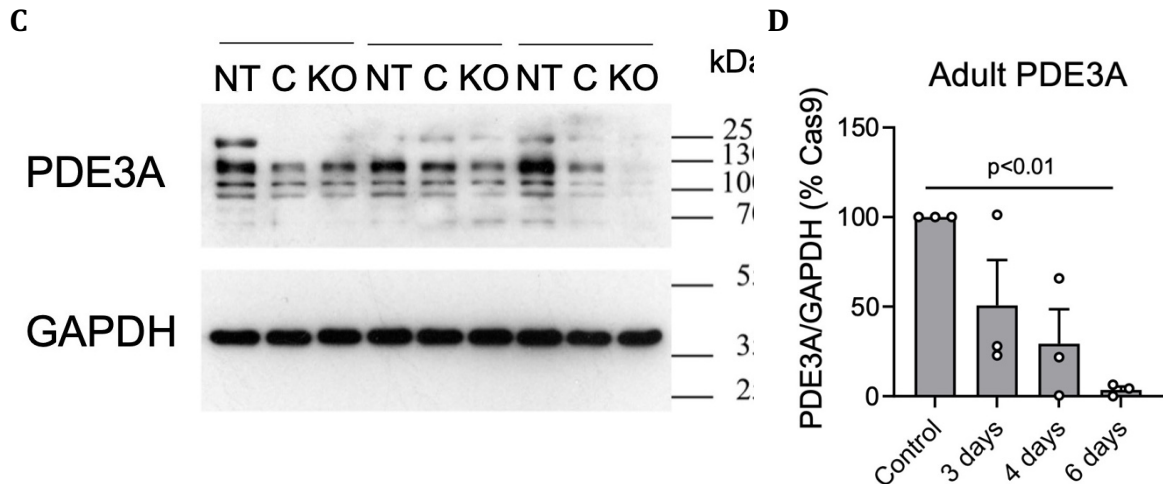


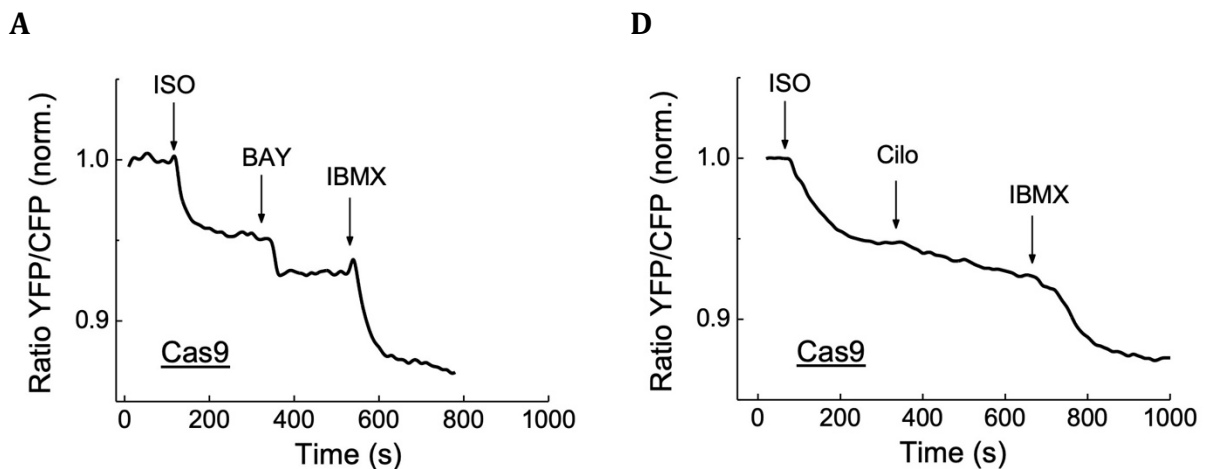
Abbildung 26: Immunoblot von PDE2A und PDE3A aus Zelllysaten adulter Kardiomyozyten

Primäre KM aus adulten WT-Ratten wurden unmittelbar nach Isolation transduziert und inkubiert. Untransduzierte (Neg, NT) oder nur mit Cas9 (Cas9, C) transduzierte Zellen dienten der negativen Kontrolle. Die Proben wurden mit Cas9 und gRNS transduziert (cas9 1 + 3A12_1, KO). Anschließend wurden die Zellen, homogenisiert und die Proteine im Immunoblot aufgetrennt. Die Normalisierung der Daten erfolgte gegen GAPDH. Die relativen PDE2A-KO- und PDE3A-KO- Werte wurden prozentual zur cas9-Kontrolle in Relation gesetzt. Die Datenpunkte der Kontrolle wurden dabei auf 100 % gesetzt. Die Auswertung der Immunoblots erfolgte mittels „ImageJ“ und „Excel“. Die p -Werte wurden mit „one-way ANOVA“ und „Sidak multiple comparison test“ berechnet. **A.** Immunoblot eines PDE3-KO. Inkubation nach Isolation für 3 Tage. Reduktion der Proteinexpression um 35%. **B.** Repräsentativer Immunoblot eines PDE2A-KO. Die Zellen wurden 3, 4, 6 Tage nach Transduktion inkubiert. **C.** Repräsentativer Immunoblot eines PDE3A-KO. Die Zellen wurden 3, 4, 6 Tage nach Transduktion inkubiert. **D.** Statistische Analyse von Immunoblots des PDE3A-KO aus drei Isolationen. 3 days: $\bar{x} = 50,1\%$, $p = 0.81$; 4 days: $\bar{x} = 29,4\%$, $p = 0.04$; 6 days: $\bar{x} = 3,6\%$, $p = 0.01$.

3.5.3 Kontrolle auf funktioneller Ebene (FRET) und Funktion spezifischer Isoformen

Auch in adulten Kardiomyozyten wurden zur Beurteilung des KO-Effektes auf funktioneller Ebene FRET-Experimente durchgeführt. Die Versuchsbedingungen sind in Abbildung 25 dargestellt.

Wie erwartet nahm in den Kontroll-Zellen die cAMP-Konzentration sowohl nach Stimulation mit Isoprenalin und IBMX als auch nach Zugabe der selektiven PDE-Inhibitoren (BAY, Cilostamid) zu.



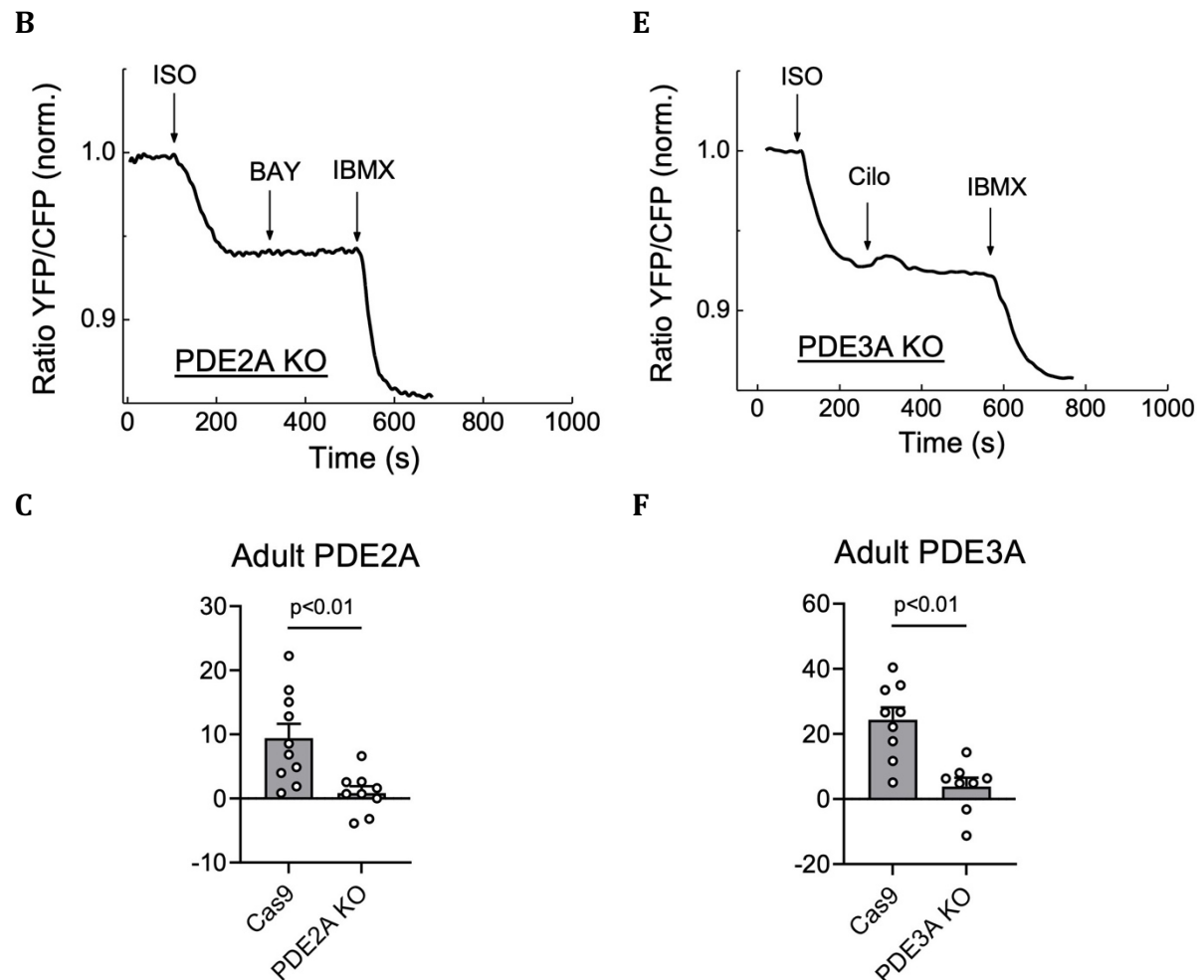


Abbildung 27: FRET adulter KM, totaler KO

Primäre KM von adulten Ratten nach Isolation mit Cas9 transduziert (Cas9), inkubiert (Abbildung 25) bzw. dienten der negativen Kontrolle. Ein KO-Effekt wurde erzielt bei gleichzeitiger Transduktion mit PDE2A_8_1, PDE2A_8_3 (PDE2A KO) oder PDE3A_12_1, PDE3A_12_2 (PDE3A KO). Anschließend wurden FRET-Experimente durchgeführt. Die Kardiomyozyten wurden mit ISO (100 nM), BAY (100 nM) oder Cilo (10 µM) und IBMX (100 µM) stimuliert. Der Zeitpunkt der Probenapplikation wird mit einem Pfeil dargestellt. Die Applikation fand statt, nachdem eine „Baseline“ erreicht wurde. Das YFP/CFP-Verhältnis wurde bestimmt. Die Auswertung der Immunoblots erfolgte mittels „ImageJ“ und „Excel“. Die *p*-Werte wurden mit „mixed ANOVA“ und „Chi-squared test“ berechnet. **A. + D.** Repräsentativer FRET-Trace einer mit cas9 (MOI 1) transduzierten Zelle. **B.** Repräsentativer FRET-Trace einer mit cas9 (MOI 1), PDE2A_8_1 und PDE2A_8_3 (MOI 3) transduzierten Zelle. **E.** Repräsentativer FRET-Trace einer mit cas9 (MOI 1), PDE3A_12_1 und PDE3A_12_2 (MOI 3) transduzierten Zelle. **C.** Statistische Analyse PDE2A-KO FRET-Experimente; *p* < 0.01. **F.** Statistische Analyse PDE3A-KO FRET-Experimente; *p* < 0.01.

Die PDE2A- und PDE3A KO-Zellen zeigen hingegen eine stark verminderte oder vollkommen aufgehobene Antwort nach Zugabe von BAY (Abbildung 27 B, C) oder Cilostamide (Abbildung 27 E, F).

Demzufolge legen auch die FRET-Experimente mit adulten KM einen erfolgreichen KO von PDE2A und PDE3A nahe. Zusätzlich lassen sich nach PDE2A KO stärkere Antworten auf ISO darstellen. Diese Ergebnisse lassen einen starken Zusammenhang von PDE2A und der Beta-adrenergen Antwort vermuten.

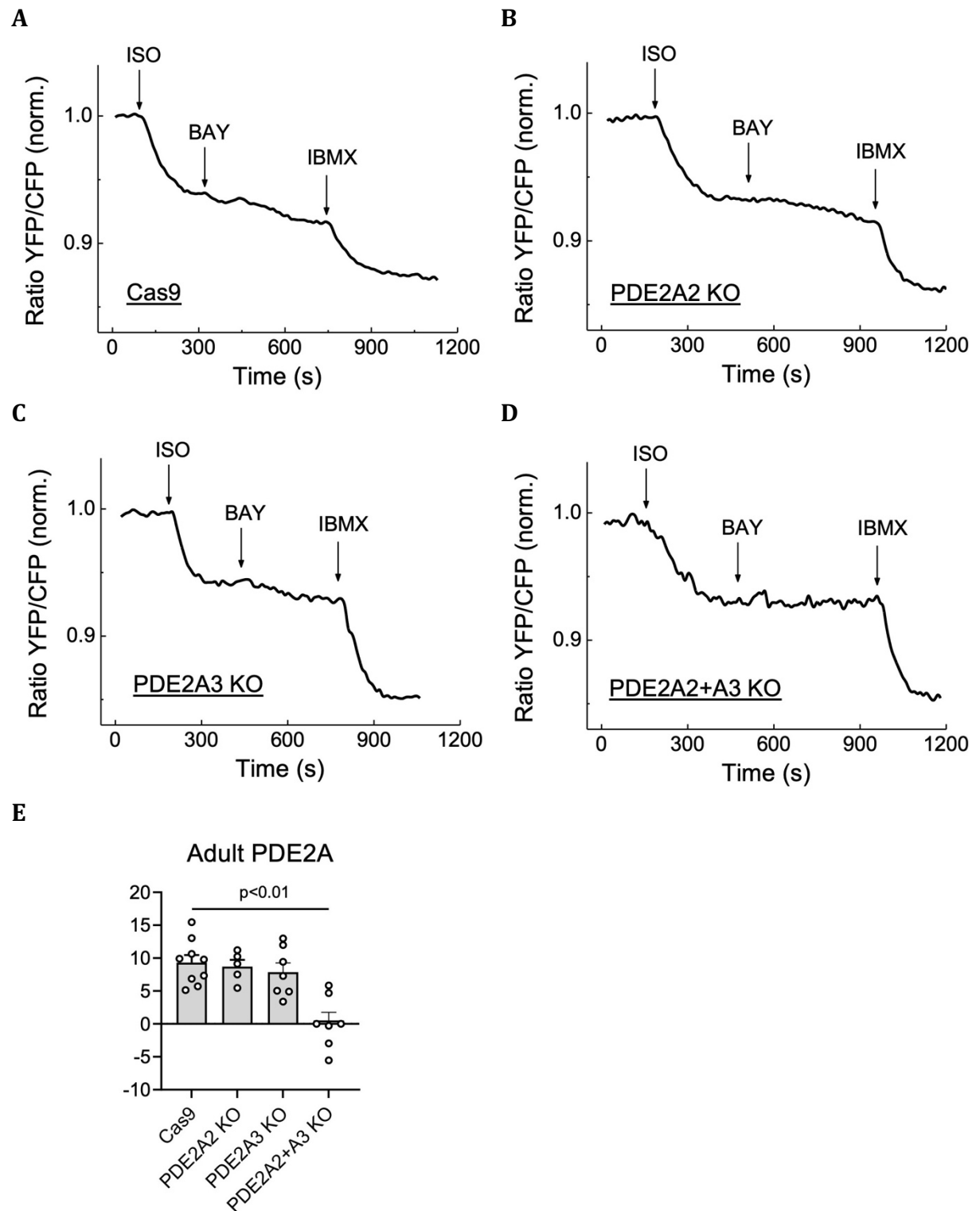


Abbildung 28: FRET adulter KM, selektiver KO spezifischer Isoformen

Primäre KM von adulten Ratten nach Isolation mit Cas9 transduziert (Cas9), inkubiert (Abbildung 25) bzw. dienten der negativen Kontrolle. Ein KO-Effekt wurde erzielt bei gleichzeitiger Transduktion mit gRNS (PDE3A KO). Anschließend wurden FRET-Experimente durchgeführt. Die Kardiomyozyten wurden mit ISO (100 nM), BAY (100 nM) oder Cilostazol (10 µM) und IBMX (100 µM) stimuliert. Der Zeitpunkt der Probenapplikation wird mit einem Pfeil dargestellt. Die Applikation fand statt, nachdem eine „Baseline“ erreicht wurde. Das YFP/CFP-Verhältnis wurde bestimmt. Die Auswertung der Immunoblots erfolgte mittels „ImageJ“ und „Excel“. Die *p*-Werte wurden mit „mixed ANOVA“ und „Chi-squared test“ berechnet. **A.** Repräsentativer FRET-Trace einer mit cas9 (MOI 1) transduzierten Zelle. **B.** Repräsentativer FRET-Trace einer mit cas9 (MOI 1), PDE2A_21_1 und PDE2A_21_2 (MOI 3) transduzierten Zelle. **C.** Repräsentativer FRET-Trace einer mit cas9 (MOI 1), PDE2A_31_1 und PDE2A_31_3 (MOI 3) transduzierten Zelle. **D.** Repräsentativer

FRET-Trace einer mit cas9 (MOI 1), PDE2A_21_1, PDE2A_21_2 PDE2A_31_1 und PDE2A_31_3 (MOI 3) transduzierten Zelle. E. Statistische Analyse PDE2A-KO FRET-Experimente; $p < 0.01$.

Im nächsten Schritt nutzten wir das CRISPR/Cas9 Editierungssystem als Mittel zur selektiven Untersuchung der Verteilung und Funktion von spezifischen Isoformen. Hierfür transduzierten wir adulte Rattenkardiomyozyten mit Cas9 und gRNS-Adenoviren, die darauf ausgelegt waren PDE2A2 (gRNS: PDE2A_21_1 und PDE2A_21_2) und PDE2A3 (gRNS: PDE2A_31_1 und PDE2A_31_3) Isoformen zu eliminieren. Die Isoformen wurden entweder nacheinander oder gleichzeitig ausgeschaltet und die FRET-Experimente mit BAY wurden am 6 Tag nach Transduktion durchgeführt.

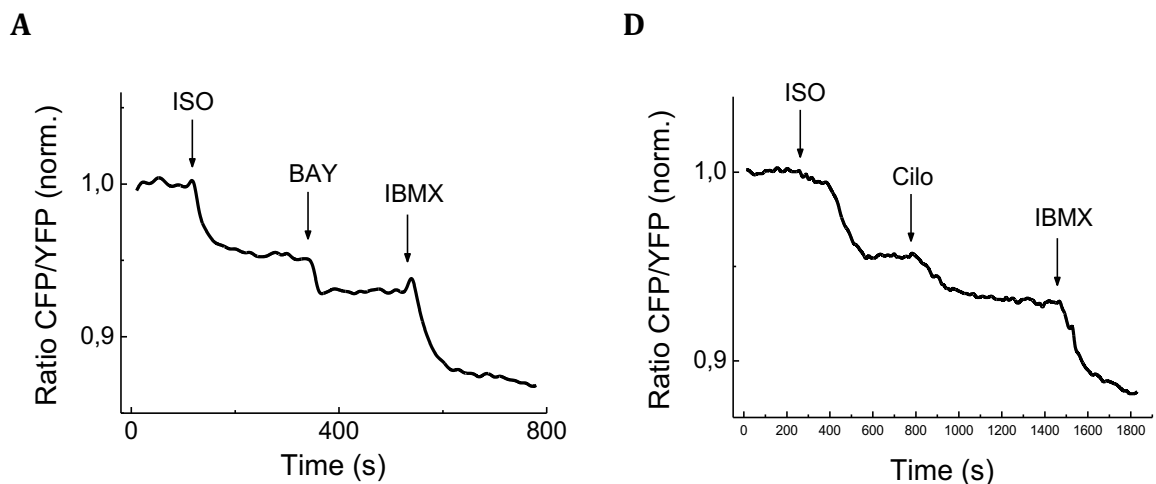
Im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 27 A), zeigten Zellen mit PDE2A2- (Abb. 27 B) und PDE2A3-KO (Abb. 27 C) nur eine geringfügig verminderte Antwort auf den PDE2-Inhibitor BAY. Jedoch führte ein kombinierter KO von PDE2A2 und PDE2A3 (Abb. 27 D) zu einer nahezu vollständig aufgehobenen BAY-Reaktion.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass mehrere Isoformen in Kombination zur Gesamttätigkeit von PDE2A in adulten KM beitragen. Bei Eliminierung einzelner PDE2A-Isoformen können die anfallenden cAMP-Konzentration von den verbleibenden Isoformen erfolgreich vermindert werden. Dennoch führte der kombinierte KO von PDE2A2 und PDE2A3 zu einer nahezu vollständig aufgehobenen BAY-Antwort, was bestätigt, dass diese Isoformen der wichtigste Beseitigungsmechanismus des anfallenden cAMP in dieser Beta-Adrenorezeptor-Mikrodomäne sind.

3.5.4 Kontrolle der CRISPR/Cas9 Spezifität

Weiterhin ermittelten wir die Selektivität der einzelnen gRNS für deren spezifische Isoform und gingen der Fragestellung nach, ob die Transduktion mit PDE2A_8_1 und PDE2A_8_3 einen Einfluss auf die funktionelle Aktivität von PDE3A und umgekehrt, ob die Transduktion mit PDE3A_12_1 und PDE3A_12_2 einen Einfluss auf die funktionelle Aktivität von PDE2A hat.

Hierfür wurden FRET-Experimente verwendet. Die Versuchsbedingungen sind in Abbildung 25 dargestellt.



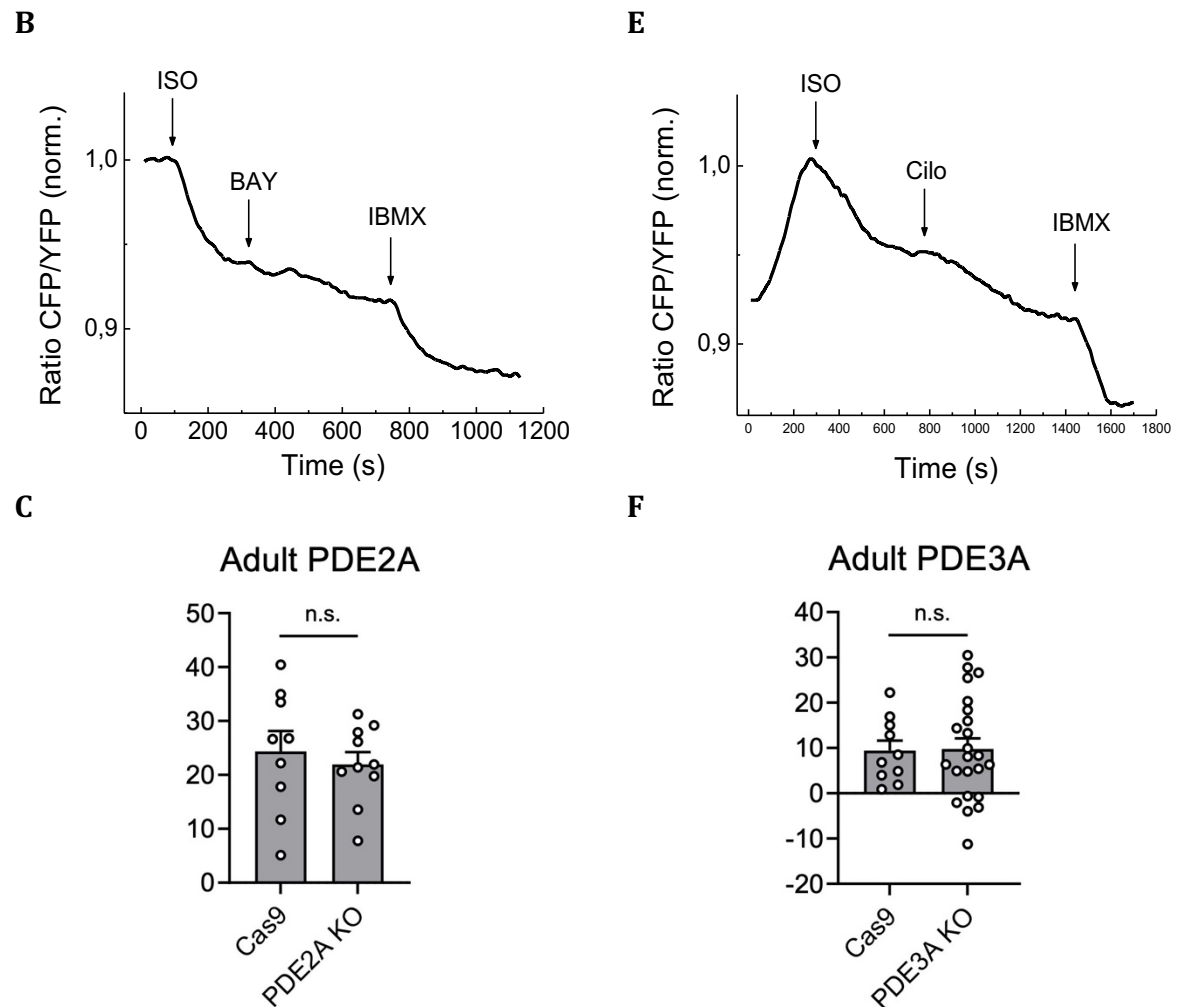


Abbildung 29: FRET adulter KM: Kontrolle der CRISPR/Cas9 Spezifität

Primäre KM von adulten Ratten nach Isolation mit Cas9 transduziert (Cas9), inkubiert (Abbildung 25) bzw. dienten der negativen Kontrolle. Ein KO-Effekt wurde erzielt bei gleichzeitiger Transduktion mit gRNS (PDE3A KO). Anschließend wurden FRET-Experimente durchgeführt. Die Kardiomyozyten wurden mit ISO (100 nM), BAY (100 nM) oder Cilo (10 µM) und IBMX (100 µM) stimuliert. Der Zeitpunkt der Probenapplikation wird mit einem Pfeil dargestellt. Die Applikation fand statt, nachdem eine „Baseline“ erreicht wurde. Das YFP/CFP-Verhältnis wurde bestimmt. Die Auswertung der Immunoblots erfolgte mittels „ImageJ“ und „Excel“. Die *p*-Werte wurden mit „mixed ANOVA“ und „Chi-squared test“ berechnet. **A + D.** Repräsentativer FRET-Trace einer mit cas9 (MOI 1) transduzierten Zelle. **B.** Repräsentativer FRET-Trace einer mit cas9 (MOI 1), PDE3A_12_1 und PDE3A_12_2 (MOI 3) transduzierten Zelle. **E.** Repräsentativer FRET-Trace einer mit cas9 (MOI 1), PDE2A_8_1 und PDE2A_8_3 (MOI 3) transduzierten Zelle. **C.** Statistische Analyse PDE2A-KO FRET-Experimente; *n.s.* **F.** Statistische Analyse PDE3A-KO FRET-Experimente; *n.s.*

Wie erwartet nahm die cAMP-Konzentration der transduzierten Zellen im gleichen Maße wie die der untransduzierten Kontrollzellen ab. Diese Befunde sprechen dafür, dass das CRISPR/Cas9 Editierungssystem spezifisch ist.

4 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde zum einen eine auf CRISPR/Cas9 basierende Methode zum KO spezifischer Isoformen in primären Zellen etabliert und im zweiten Schritt zur Untersuchung der Funktion von PDE2A und PDE3A und derer spezifischer Isoformen in Herzmuskelzellen genutzt. Die Diskussion wird aus diesem Grund in drei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt beschäftigen wir uns mit der Etablierung der Methode. Im zweiten Abschnitt steht die Funktion der PDE im Vordergrund. Im dritten Abschnitt diskutieren wir die Limitationen der Methode und ziehen eine Schlussfolgerung.

4.1 Etablierung der auf CRISPR/Cas9 basierenden Methode zur Knockoutierung spezifischer Isoformen in primären Zellen

Derzeit existiert eine Vielzahl von Methoden zur gezielten Untersuchung von Genfunktionen. RNS-Interferenz (RNSi) hat sich als Methode in der Antisense Oligonukleotide (AO) durchgesetzt, da sie deutlich mehr Vorteile im Vergleich zu herkömmlichen AO bietet. Diese Methode untersucht Gene durch deren Knockdown, ist kostengünstig und einfach anzuwenden. Die Effizienz des KO ist hoch und die effektive Konzentration und somit die Nebenwirkungen für den gewünschten KO-Effekt der RNSi ist beträchtlich niedriger als die Konzentration für alternative Antisense Oligonukleotid-Verfahren. Diese Methode wird bereits in klinischen Studien verwendet und 4 Therapeutische Mittel wurden von der „Food Drug Administration“ bereits zugelassen. Dennoch bietet die RNSi keine vollständige Inaktivierung des gewünschten Gens und die Stärke des Knockdowns variiert von Ziel-DNS zu Ziel-DNS. Eine besondere Nebenwirkung ist die Aktivierung der Typ 1 Interferon Antwort, wodurch ungewollte zelluläre Effekte hervorgerufen werden[118].

Es bestehen ebenfalls elegante Methoden auf der Grundlage vom Einsatz katalytisch inaktiver Enzyme, die das zu untersuchende Enzym im Ziel ersetzen. Doch auch diese Methode besitzt viele unerwünschte Effekte. Auch hier kommt es nicht zur Vollständiger Eliminierung der Enzymaktivität. Ein besonderer Nachteil ist die Überexpression der inaktiven Proteine, die schwer zu kontrollieren ist und zu unerwünschten und unvorhersehbaren Effekten in der Zielzelle führt[79].

Die Genom-Editierung dient heute weiterhin als "Goldstandard" für die Bestimmung von Genfunktionen. ZFNs und TALENs wurden in der Vergangenheit für Gen-Editierung verwendet. Doch wurde die Gen-Editierung durch die Entdeckung der RNS-gesteuerten Cas9 Nuklease revolutioniert, denn ihr einfaches Design für beliebige genomische Sequenzen, die simple Vorhersage von off-Targets und die Möglichkeit mehrere Gensequenzen gleichzeitig zu modifizieren bietet gegenüber der ZFN und TALEN einen klaren Vorteil.

Für die Etablierung dieser Methode in primären Zellen wurden 15 gRNS entworfen. Die gRNS target-Sequenzen wurden zunächst in das Plasmid pDNR221_U6gRNS und anschließend mittels LR-Rekombination in das Adenovirus expressierende pAD-Plasmid kloniert. Aufgrund der hohen Rekombinationswahrscheinlichkeit der DNS-Sequenzen von ca. 33% schlagen wir eine Überprüfung insbesondere der gRNS target-Sequenzen der Proben, um eine höhere Effektivität zu erreichen. Hierfür nutzten wir die schnellen und günstigen Methoden, die gradient- und nested-PCR. Als alternative Methode zur Überprüfung von Rekombinationen könnte die Sequenzierung verwendet werden.

Des Weiteren wird die Effektivität des KO erheblich gesteigert, wenn statt einer gRNS, zwei gRNS expressierende Adenoviren genutzt werden. Falls eines der cas9-Konstrukte die target-Sequenz nicht durchtrennt, kann der KO dennoch durch das weitere Konstrukt erfolgen. Dies hat den Hintergrund, dass unterschiedliche gRNS-Cas9 Konstrukte eine unterschiedliche Effektivität aufweisen. Es wurden verschiedene Scores entwickelt („Doench et al. 2016“ und „Moreno-Mateso“), um die Qualität der gRNS target Sequenzen widerzuspiegeln. Somit empfehlen wir die Nutzung dieser Scores bei der Auswahl der passenden gRNS-target Sequenz.

Die gRNS-target Sequenzen wurden vor einen U6 Promotor kloniert. Der U6 Promotor zeigt die höchste Effektivität, wenn das erste Nukleotid des Transkripts ein Guanidin ist. Demzufolge war darauf zu achten, dass das erste Nukleotid der gRNS-target Sequenz ein Guanidin ist.

Im weiteren Schritt bestimmten wir die bestmöglichen Bedingungen für die höchste Wirksamkeit des KO, indem wir die Konzentration der gRNS und des cas9 expressierenden Adenovirus anpassten und die optimale Dauer ermittelten, die die Zellen nach Transduktion in der Zellkultur kultiviert wurden. Adulte und neonatale KM reagieren sehr empfindlich auf hohe Viruskonzentrationen. Vor allem mit steigender Konzentration des cas9 expressierenden Virus sinkt das Überleben und die Qualität der Zellen. Das Ziel bestand darin einen MOI mit kleinstmöglicher Toxizität und höchstmöglichem KO-Effekt zu bestimmen. Bei adulten Zellen liegt diese bei MOI 300 und bei neonatalen bei MOI 1. Ebenfalls zu beachten ist, dass sich die Qualität der Viren unterschiedlicher Amplifikationen stark unterscheidet. Aus diesem Grund empfehlen wir eine erneute Bestimmung der optimalen MOI des Virus nach jeder Amplifikation.

Wir konnten den KO auf mehreren Ebenen nachweisen. Mittels qPCR bestätigten wir eine signifikante Verminderung der mRNA-Menge von PDE2 ($81 \pm 2\%$) und PDE3 ($43 \pm 8\%$) in neonatalen KM bereits 3 Tage nach Transduktion. Die stärkere Verringerung der PDE2 mRNA führten wir auf eine möglicherweise geringere Halbwertszeit dieser zurück.

Wir analysierten chromosomale DNS mittels PCR und Sequenzierung und ermittelten, dass bereits niedrige MOI zu einem KO führen, wobei hohe MOI zu einer Deletion des gesamten Lokus führen. Erklärt wird dies dadurch, dass bei erfolgreicher Wirkung beider gRNS-Cas9 Konstrukte die DNS-Sequenz an zwei Stellen zerschnitten wird und somit der gesamte Lokus exzidiert wird. Bei geringerer MOI der gRNS-expressierenden Viren kommt es zur Transduktion von nur einer der gRNS-Cas9-Konstrukte in die Zielzelle, sodass es lediglich zu einem KO und nicht zur vollständigen Deletion kommt. Diese Ergebnisse spiegeln wider, dass die Nutzung zweier unterschiedlicher gRNS ermöglicht eine geringere MOI zu verwenden, die somit weniger toxisch für die Zellen ist. In dieser Arbeit beabsichtigten wir nach einem erfolgreichen KO die Funktion der Phosphodiesterasen mit FRET-Experimenten zu untersuchen. Die Zellqualität muss für aussagekräftige FRET-Experimente möglichst hoch sein. Eine Abnahme der Zellqualität hat Einfluss auf die Antwort der Zellen auf die Zugabe von Reagenzien während der FRET-Messungen. Somit ist eine geringe Zellqualität ein Störfaktor, der für empfindliche FRET-Messungen möglichst eliminiert werden muss. Dazu kommt, dass die Zellqualität nicht nur durch Zugabe der gRNS und cas9 expressierenden Viren, sondern auch durch viele weitere Faktoren abnehmen kann. Vor der Durchführung der FRET-Experimente werden die Zellen zusätzlich mit Sensor-expressierenden Viren transduziert und 24 weitere Stunden in der Zellkultur kultiviert. Dies führt zu weiterem Zellverlust und der Abnahme der Zellqualität. Demzufolge kann die von uns entwickelte Methode auch mit empfindlichen Methoden kombiniert werden.

Die von uns entwickelte Methode für KO in primären Zellen hat einen großen Anwendungsbereich und kann für die Untersuchung einer Vielzahl von Proteinen genutzt werden. Falls diese Methode mit weniger empfindlichen Untersuchungen kombiniert wird, kann die MOI der cas9 und gRNS expressierenden Viren erhöht werden, um die KO-Wahrscheinlichkeit zu steigern.

Ebenfalls untersuchten wir die Effektivität des CRISPR/Cas9 Systems mittels Westernblots. Es gelang uns die Menge von PDE2A und PDE3A sowohl in neonatalen KM (PDE2A: 54,3%; PDE3A: 42,5%) als auch in adulten (PDE2A: 4%; PDE3A: 3,6%) signifikant zu verringern. Der Rückgang der PDE-Spiegel war in neonatalen KM 14 Tage und bei adulten KM bereits 6 Tage nach Transduktion ausgeprägt. PCR-Experimente und Westernblots illustrierten allzeit signifikanten, wenn auch unvollständigen KO. Dies lassen wir auf variable gRNS-Effizienz, Cas9-Expression oder Überwucherung nicht-transduzierter Zellen zurückzuführen.

FRET-Experimente sind bei der Detektion von KO-Zellen zuverlässiger. Das Plasmid pDNR221_U6gRNA beinhaltet eine Sequenz (mMaroon), welches die Zelle bei erfolgreicher Transduktion rot fluoreszieren lässt. Somit können transduzierte Zellen präzise identifiziert werden. Für zukünftige Experimente könnte man diesen Ansatz erweitern, indem man in das cas9-expressierende Plasmid ebenfalls eine zusätzliche Sequenz einfügt, die das Plasmid in einer weiteren Farbe fluoreszieren lässt. Auf funktioneller Ebene zeigten bei Durchführung der FRET-Experimente fast alle Zellen vollständig aufgehobene Effekte von PDE2- und PDE3-Inhibitoren auf intrazelluläre cAMP-Spiegel.

Unbeabsichtigte Mutationen oder Genom-Editierungen durch das CRISPR/Cas9 -Genom-Editierungssystem werden als off-Targets bezeichnet und sind bei der Anwendung dieser Methode stets befürchtet. Eine zuverlässige Maßnahme zur Vorbeugung dieser ist die gründliche Auswahl passender gRNS-target Sequenzen. Bestimmte Sequenzen sind deutlich anfälliger für off-targets als andere. In dieser Arbeit nutzten wir Programme und scoring-Systeme, um die off-target Wahrscheinlichkeit zu verringern. Zuletzt belegten wir die Selektivität dieser Methode auf funktioneller Ebene. In FRET-Experimenten hatte der PDE2 Inhibitor BAY keinen signifikanten Einfluss auf PDE3A-KO Zellen und umgekehrt Cilostamide auf PDE2A-KO Zellen.

Die von uns entwickelte Methode ermöglicht es, das CRISPR/Cas9-Editierungssystem in primäre Ratten-KM einzuführen und erfolgreich Proteine und darüber hinaus einzelne Isoformen präzise und spezifisch zu knockoutieren. Pharmakologische Enzyminhibitoren sind häufig wenig spezifisch und interagieren mit anderen Enzymfamilien. Um so komplizierter ist es spezifische Inhibitoren für Isoformen zu entwickeln, deren katalytische Domänen identisch sind. Dennoch ist die spezifische Inhibition von Enzymen und derer Isoformen von hoher Bedeutung, da es nicht nur wichtige Erkenntnisse über die Funktion der Isoformen liefert, sondern auch das Nebenwirkungsspektrum stark reduziert. Denn, je spezifischer eine Inhibition eines Proteins, desto weniger Nebenwirkungen weist diese auf. Durch den spezifischen cas9-vermittelten KO bestimmter Isoformen ohne die gleichzeitige Beeinflussung anderer, könnten ungewollte Nebenwirkungen der PDE-Inhibitor-Therapie vermieden werden.

Wir erwarten, dass diese Methode in Zukunft in zahlreichen Bereichen Verwendung finden wird. Es ist nicht nur auf die PDE-Familie begrenzt, sondern kann in der Erforschung sämtlicher Proteine Gebrauch finden. Weiterhin ist diese Methode nicht nur auf den cAMP- und cGMP-Signalweg beschränkt, sondern kann in der Aufschlüsselung jeglicher Interaktionsmechanismen in der Zellen Applikation finden.

Ebenso können mittels dieser Methode KO in Zellen verschiedener Tiere generiert werden, nicht zuletzt auch in humanen Zellen. Eine Vielzahl von Ergebnissen aus Experimenten mit Tieren können auf Menschen nicht übertragen werden. Aus ethischer Sicht konnten bislang keine KO auf humanen Zellen durchgeführt werden. Demzufolge ermöglicht unsere Methode Erkenntnisse aus Tierexperimenten auf Menschen zu übertragen.

Ebenfalls fördert diese Methode die Erforschung einer Vielzahl von Proteinen, die durch konventionelle KO-Methode nicht erforscht werden konnten. Oftmals führen kompensatorische Mechanismen bei vollständigem KO eines Proteins seit der frühen Entwicklung zu Anpassungsänderungen in anderen Signalwegen. Die gewonnenen Erkenntnisse aus diesen Experimenten bilden die Funktion spezifischer Proteine nicht akkurat ab. Durch die Zugabe von Viren mit dem CRISPR/Cas9-Editierungssystem haben Wissenschaftler die Wahl, zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung der Zelle der KO des spezifischen Proteins geschehen soll. Somit wird die Funktion der Proteine deutlicher widerspiegelt. Zusätzlich dazu können Proteine knockoutiert werden, die zum Zeitpunkt der Entwicklung des Organismus eine essenzielle Rolle spielen. Mittels alternativer Methoden war es oftmals nicht möglich diese Proteine auszuschalten, da ansonsten der Organismus nicht lebensfähig wäre. Durch den KO der Proteine zu einem späteren Zeitpunkt, bei der der Organismus bereits ausgeheilt ist, umgehen wir dieses Problem.

Auch bietet die Methode aus Sicht der Kosten und des Zeitaufwandes einen deutlichen Vorteil gegenüber den herkömmlichen Methoden. Die Generierung einer Tierlinie dauert mehrere Monate bis Jahre. Die Generierung primärer KO-Zellen mittels adenoviraler Transduktion nur wenige Tage. Dieser Vorteil ist in der modernen Wissenschaft um so wichtiger, da nach immer mehr Alternativen zu Tierexperimenten gesucht wird.

4.2 Funktion von PDE2A und PDE3A und derer spezifischer Isoformen in Herzmuskelzellen

PDE2 und PDE3 wurde für diese Arbeit ausgewählt, da beide eine entscheidende Rolle in der Regulation der cAMP und cGMP-Konzentration, Kompartimentierung und dem „second messenger crosstalk“ spielen[181]. Gleichzeitig sind diese PDEs wichtige therapeutische Zielproteine bei Herzerkrankungen wie der Herzinsuffizienz[3]. Unter physiologischen Bedingungen schützt die PDE2 Aktivität vor der Überaktivierung des beta-adrenergen Signalweges, doch könnte es bei Herzerkrankungen zur Entwicklung einer kontraktile Dysfunktion beitragen[61]. Die Inhibition von PDE3 verbessert durch Steigerung der kardialen Kontraktilität die hämodynamischen Verhältnisse, jedoch wird die Mortalität von Patienten mit dekompensierter Herzinsuffizienz erhöht[182]. Die Funktionen spezifischer Isoformen der PDEs sind weiterhin unbekannt, zum Teil, weil es Mittels konventioneller Verfahren zur Gen-Editierung nicht möglich war, Isoform-KO zu erzeugen.

Zunächst identifizierten wir die Expression der Isoformen in adulten und neonatalen KM. In neonatalen KM wird lediglich PDE2A2 als Isoform von PDE2A und PDE3A1 als Isoform von PDE3A exprimiert, wohingegen in adulten KM PDE2A1, PDE2A2, PDE2A3 und PDE3A1 exprimiert werden. Demzufolge ist die mitochondriale PDE2A2-Isoform die einzige PDE2-abhängige Regulation von cAMP im Gegensatz zu der PDE2-Abhängigen Regulation in adulten KM, die wesentlich komplexer verläuft. Aus diesem Anlass bietet es sich in Zukunft an die Isoform Funktion in Subkompartimenten adulter Myozyten zu

untersuchen. Ebenfalls konnten wir weder in neonatalen noch in adulten KM die Expression von PDE3A2 und PDE3A3 darstellen. Diese Ergebnisse suggerieren, dass im Gegensatz zu humanen KM[92], PDE3A1 als einzige Isoform in Ratten KM exprimiert wird. Ein interessanter Ansatz wäre die Charakterisierung der PDE3A-Isoformen mittels spezifischer Antikörper in zukünftigen Experimenten.

Ein besonderes Interesse stellen die Ergebnisse der FRET-Experimente von spezifischen Isoform-KO dar. Durch die Beseitigung von nur der PDE2A2 oder PDE2A3 Isoform in adulten KM konnte die BAY-Antwort nur geringgradig vermindert werden. Ein kombinierter KO von PDE2A2 und PDE2A3 konnte die BAY-Antwort vollständig aufheben, was die entscheidende Rolle dieser Isoformen in der Kontrolle der cAMP-Konzentrationen in adulten KM verifiziert.

Interessanterweise ließ sich eine stärkere Antwort der Zellen auf ISO nach PDE2A-KO verzeichnen, was eine besonders starke funktionelle Interaktion von PDE2 mit der beta-adrenergen Antwort in dieser Mikrodomäne suggeriert.

4.3 Schlussfolgerung

Unsere Daten zeigen, dass CRISPR/Cas9 ein effektives und praktisches Werkzeug für den In-vitro-KO von PDE2A und PDE3A ist. Die von uns entwickelte Methode bietet im Vergleich zu herkömmlichen Methoden eine Reihe von Vorteilen. Sie ermöglicht einen spezifischen KO von Proteinen und derer Isoformen. Der Zeitpunkt des KO kann frei gewählt werden und die Methode kann zur Untersuchung der Funktion sämtlicher Proteine in einer Vielzahl von Organismen genutzt werden. Diese Methode stellt eine kostengünstigere Alternative zu herkömmlichen Tierexperimenten dar.

Mögliche Limitationen unserer Arbeit umfassen die fehlende Differenzierung des KO-Effekts auf einzelne Zellen, was eine Folge der angewandten Methoden ist, die für die Analyse eine Vielzahl von Zellen benötigen. Zusätzlich wurden zum jetzigen Zeitpunkt keine Isoform-spezifischen PDE2A-Antikörper charakterisiert. Demzufolge kann der individuelle Isoform-spezifische KO im Falle von PDE2A in Westernblot-Experimenten nicht verifiziert werden. Es wäre interessant den KO-Effekt in zukünftigen Experimenten mit Methoden wie der Immunhistochemie darzustellen, da sie eine größere Auflösung bieten. Weiterhin sind die Limitationen dieser Methode die gleichen, wie die Limitierungen der CRISPR/Cas9 Nuklease als Geneditierungsverfahren. Es sollte stets die Möglichkeit eines off-target Effektes beachtet werden. Mögliche unerwünschte Interaktionen sollten im Voraus stets kalkuliert und gegebenenfalls auf experimentellem Wege kontrolliert und ausgeschlossen werden. Diese Methode weist zudem gewisse Limitationen auf. Für die Herstellung einer gRNS muss der gewünschte DNS-Abschnitt eine PAM-Sequenz beinhalten. Weiterhin kann ein effektiver KO nur gewährleistet werden, wenn die mögliche gRNS-target Sequenz die oben genannten Voraussetzungen erfüllt.

Dennoch erwarten wir, dass dieser neue Ansatz zur Erforschung spezifischer Funktionen von PDE-Isoformen beitragen wird und in einer Vielzahl von Experimenten Einsatz finden wird, einschließlich in der Gen-Editierung humaner Zellen.

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Die zyklischen Nukleotid-Phosphodiesterasen PDE2A und PDE3A spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Kompartimentierung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) sowie beim cGMP-zu-cAMP-crosstalk. Diese PDEs dienen auch als therapeutische Zielmoleküle für kardiale Pathologien wie der Herzinsuffizienz. In gesunden Herzen schützt die PDE2A-Aktivität vor einer Überaktivierung des beta-adrenergen Signalwegs, jedoch führt sie bei Herzpathologien zur Abnahme der Kontraktionskraft. Die Hemmung von PDE3A steigert die Kontraktilität, führt jedoch bei chronischer Gabe zum Anstieg der Mortalität von Patienten mit dekompensierter Herzinsuffizienz. Beide PDEs haben drei verschiedene Isoformen, d. h. PDE2A1-2A3 und PDE3A1-3A3. Die spezifischen Funktionen der Isoformen sind jedoch größtenteils unbekannt, teilweise weil es bisher nicht möglich war, isoformenspezifische Knockout-Mäuse mit konventionellen Methoden zu erzeugen. Durch selektive pharmakologische Modulation könnten theoretisch unerwünschte Effekte der PDE-Inhibitor-Therapie vermieden werden. Diese Arbeit untersuchte, ob das CRISPR/Cas9-Editierungssystem für in-vitro-PDE-Knockouts verwendet werden kann.

Ziele der Arbeit:

Die Etablierung einer neuen Methode zur schnelleren, kostengünstigeren und weniger tierintensiven Methode zur Erstellung von totalen und spezifischen Isoform-Knockouts in primären Zellen und die Erforschung der Funktion von PDE2A und PDE3A und ihrer Isoformen in Rattenkardiomyozyten.

Ergebnisse: Verschiedene PDE2A- und PDE3A-Isoform-spezifische gRNS-Konstrukte wurden entwickelt, kloniert und in adenovirale Expressionsvektoren eingeführt. Adulte und neonatale Rattenkardiomyozyten wurden isoliert, mit verschiedenen Mengen von Adenoviren transduziert (Cas9 in Kombination mit PDE2A- oder PDE3A-gRNS-Konstrukten) und bis zu 6 (adulte) oder 14 (neonatale) Tage kultiviert, um die Dynamik der PDE-Expression durch Western Blot, qPCR und PCR-Sequenzierung des spezifischen Locus zu analysieren. Es wurden erfolgreich Adenoviren zur Expression von Cas9 in Myozyten hergestellt und die Cas9-Expression durch Immunoblots 2 Tage nach der Transduktion nachgewiesen. Eine optimale "Multiplicity of Infection" (MOI) von 300 (adulte) und 1 (neonatale Kardiomyozyten) wurde durch Tests mit verschiedenen Mengen von Adenoviren ausgewählt. Die Transduktion der Myozyten mit Cas9 und den neu entwickelten PDE-gRNS-Adenoviren führte zu spezifischen Knockouts von PDE2A und PDE3A sowohl bei adulten als auch bei neonatalen Kardiomyozyten. Eine Abnahme der mRNA-Expression von PDE2A ($81 \pm 2\%$) und PDE3A ($43 \pm 8\%$) wurde 3 Tage nach der Transduktion festgestellt. 6 Tage nach der Transduktion konnten 4% PDE2A und 3,6% PDE3A im Vergleich zu nicht gRNS-exprimierenden Zellen in adulten Kardiomyozyten nachgewiesen werden. 14 Tage nach der Transduktion wurde die Proteinexpression in neonatalen Kardiomyozyten auf 54,3% im Fall von PDE2A und 42,5% für PDE3A reduziert. Ein PCR-Sequenzierungsassay zeigte eine Reduktion von Peaks und zusätzliche Peaks im gezielten Locus bei niedrigem MOI (MOI cas9 1 und MOI gRNS 0,5-10) sowie Deletionen des gezielten Locus bei höherem MOI (MOI cas9 3-10 und MOI gRNS 3-10) in neonatalen Kardiomyozyten. Messungen von cAMP mittels Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) zeigten eine reduzierte Reaktion auf selektive PDE2- und PDE3-Inhibition in Knockout-Myozyten im Vergleich zu untransduzierten Kontrollzellen sowohl bei adulten als auch bei neonatalen Rattenkardiomyozyten. Außerdem wurde mittels RT-PCR die Expression von PDE2A2 und PDE3A1 Isoformen in neonatalen Kardiomyozyten bestätigt, während keine Expression von PDE2A1, PDE2A3, PDE3A2 und PDE3A3

nachgewiesen werden konnte. In adulten Kardiomyozyten wurde dagegen die Expression von PDE2A1, PDE2A2, PDE2A3 und PDE3A1 bestätigt und keine Expression von PDE3A2 und PDE3A3.

Fazit: Unsere Daten zeigen, dass CRISPR/Cas9 ein effektives und praktisches Werkzeug für den In-vitro-Knockout von PDE2A und PDE3A ist. Es kann erwartet werden, dass dieser neue Ansatz zur Erforschung spezifischer Funktionen von PDE-Isoformen beitragen wird und in einer Vielzahl von Experimenten Einsatz finden kann, einschließlich Gen-Editierung humaner Zellen.

ABSTRACT

Background: cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE2A and PDE3A play an important role in the regulation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) compartmentation as well as in cGMP-to-cAMP crosstalk. These PDEs serve also as therapeutic targets for cardiac pathologies such as heart failure. In healthy hearts, PDE2A activity protects from overactivation of the beta-adrenergic pathway but in failing hearts, it may decrease contractile reserve. PDE3A inhibition improves contractility but increases mortality upon chronic treatment of patients with decompensated heart failure. Each of these PDEs has 3 distinct isoforms, i.e. 2A1-2A3 and 3A1-3A3. However, specific isoform functions remain largely unknown, partially because it has not been possible to generate isoform specific knockout mice using conventional methods. Selective pharmacological modulation of specific isoforms without impacting the others might avoid side-effects of PDE inhibitor therapy. Here, we studied whether CRISPR/Cas9 approach for precise gene editing can be used to knockout PDEs *in vitro*.

Aim of the study: Our aim was to establish a new method for total protein and specific isoform knockout in primary cells and the investigation of PDE2A and PDE3A and their isoform function in rat cardiomyocytes.

Results: Several PDE2A and PDE3A isoform specific gRNA constructs were cloned and introduced into adenoviral expression vectors. Adult and neonatal rat cardiomyocytes were isolated, transduced with different amounts of adenoviruses (cas9 in combination with PDE2A or PDE3A gRNA constructs) and cultured for up to 6 (adult) or 14 (neonatal) days to analyse the dynamics of PDE expression by Western blot, qPCR and PCR-sequencing assay of the targeted locus. We have successfully produced functional adenoviruses to express Cas9 in myocytes and detected Cas9 expression by immunoblots 2 days after transduction. An optimal multiplicity of infection (MOI) of 300 (adult) and 1 (neonatal) was selected by testing different amounts of adenovirus. Co-transduction of myocytes with Cas9 and newly developed PDE gRNA adenoviruses led to specific knockouts of PDE2A and PDE3A both in adult and neonatal cardiomyocytes. A decline of mRNA expression in PDE2A ($81 \pm 2\%$) and PDE3A ($43 \pm 8\%$) was detected at 3 days after transduction. At 6 days after transduction 4% PDE2A and 3,6% PDE3A could be detected compared to non gRNA expressing cells in adult cardiomyocytes and at 14 days after transduction, protein expression in neonatal cardiomyocytes was reduced to 54,3% in the case of PDE2A and 42,5%, for PDE3A. A PCR-sequencing assay showed reduction in peaks and additional peaks in the targeted locus at low of MOI (MOI cas9 1 and MOI gRNA 0,5-10) and deletions of the targeted locus at higher MOI (MOI cas9 3-10 and MOI gRNA 3-10) in neonatal cardiomyocytes. FRET experiments showed a reduced response to selective PDE2A and PDE3A inhibition in knockout myocytes compared to untransduced control cells in both adult and rat cardiomyocytes. Also, we confirmed PDE2A2 and PDE3A1 expression and no expression of PDE2A1, PDE2A3, PDE3A2 and PDE3A3 in neonatal cardiomyocytes and using an RT-PCR assay. In adult cardiomyocytes, we confirmed PDE2A1, PDE2A2, PDE2A3 and PDE3A1 expression and no expression of PDE3A2 and PDE3A3.

Conclusion: Our data show that CRISPR/Cas9 is an effective and practical tool for *in vitro* knockout of PDE2A and PDE3A. This novel approach should help to analyze specific functions of PDE isoforms and can be used in a plethora of experiments, including gene editing in human cells.

LITERATURVERZEICHNIS

Reference List

1. Skryabin, E.B., et al., *CRISPR/Cas9 Knock-Out in Primary Neonatal and Adult Cardiomyocytes Reveals Distinct cAMP Dynamics Regulation by Various PDE2A and PDE3A Isoforms*. Cells, 2023. **12**(11).
2. Gancedo, J.M., *Biological roles of cAMP: variations on a theme in the different kingdoms of life*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2013. **88**(3): p. 645-68.
3. Zaccolo, M. and M.A. Movsesian, *cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology*. Circ Res, 2007. **100**(11): p. 1569-78.
4. de Rooij, J., et al., *Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP*. Nature, 1998. **396**(6710): p. 474-7.
5. Larsson, H.P., *How is the heart rate regulated in the sinoatrial node? Another piece to the puzzle*. J Gen Physiol, 2010. **136**(3): p. 237-41.
6. Bers, D.M., *Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes*. Annu Rev Physiol, 2008. **70**: p. 23-49.
7. Strang, K.T., et al., *Beta-adrenergic receptor stimulation increases unloaded shortening velocity of skinned single ventricular myocytes from rats*. Circ Res, 1994. **74**(3): p. 542-9.
8. Lompre, A.M., et al., *Ca²⁺ cycling and new therapeutic approaches for heart failure*. Circulation, 2010. **121**(6): p. 822-30.
9. Perera, R.K. and V.O. Nikolaev, *Compartmentation of cAMP signalling in cardiomyocytes in health and disease*. Acta Physiol (Oxf), 2013. **207**(4): p. 650-62.
10. Evgenov, O.V., et al., *NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(9): p. 755-68.
11. Hardman, J.G. and E.W. Sutherland, *Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate*. J Biol Chem, 1969. **244**(23): p. 6363-70.
12. Schultz, G., E. Böhme, and K. Munske, *Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity*. Life Sci, 1969. **8**(24): p. 1323-32.
13. White, A.A. and G.D. Aurbach, *Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues*. Biochim Biophys Acta, 1969. **191**(3): p. 686-97.
14. Boerrigter, G., H. Lapp, and J.C. Burnett, *Modulation of cGMP in heart failure: a new therapeutic paradigm*. Handb Exp Pharmacol, 2009(191): p. 485-506.
15. Montfort, W.R., J.A. Wales, and A. Weichsel, *Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor*. Antioxid Redox Signal, 2017. **26**(3): p. 107-121.
16. Potter, L.R., S. Abbey-Hosch, and D.M. Dickey, *Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions*. Endocr Rev, 2006. **27**(1): p. 47-72.
17. Hofmann, F., et al., *cGMP regulated protein kinases (cGK)*. Handb Exp Pharmacol, 2009(191): p. 137-62.
18. Lorenz, R., D. Bertinetti, and F.W. Herberg, *cAMP-Dependent Protein Kinase and cGMP-Dependent Protein Kinase as Cyclic Nucleotide Effectors*. Handb Exp Pharmacol, 2017. **238**: p. 105-122.

19. Fiedler, B., et al., *Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(17): p. 11363-8.
20. Yuasa, K., et al., *A novel interaction of cGMP-dependent protein kinase I with troponin T*. J Biol Chem, 1999. **274**(52): p. 37429-34.
21. Lalli, M.J., et al., *[Ca²⁺]_i homeostasis and cyclic nucleotide relaxation in aorta of phospholamban-deficient mice*. Am J Physiol, 1999. **277**(3): p. H963-70.
22. James, Z.M., et al., *CryoEM structure of a prokaryotic cyclic nucleotide-gated ion channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(17): p. 4430-4435.
23. Mazzolini, M., et al., *The gating mechanism in cyclic nucleotide-gated ion channels*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 45.
24. Baillie, G.S., G.S. Tejeda, and M.P. Kelly, *Therapeutic targeting of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases: inhibition and beyond*. Nat Rev Drug Discov, 2019. **18**(10): p. 770-796.
25. Simon, J.N., et al., *Nitric oxide synthase regulation of cardiac excitation-contraction coupling in health and disease*. J Mol Cell Cardiol, 2014. **73**: p. 80-91.
26. Jurevicius, J. and R. Fischmeister, *cAMP compartmentation is responsible for a local activation of cardiac Ca²⁺ channels by beta-adrenergic agonists*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 295-9.
27. Tsien, R.Y., B.J. Bacskaï, and S.R. Adams, *FRET for studying intracellular signalling*. Trends Cell Biol, 1993. **3**(7): p. 242-5.
28. Willoughby, D. and D.M. Cooper, *Live-cell imaging of cAMP dynamics*. Nat Methods, 2008. **5**(1): p. 29-36.
29. Zaccolo, M., et al., *A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(1): p. 25-9.
30. Bork, N.I., C.E. Molina, and V.O. Nikolaev, *cGMP signalling in cardiomyocyte microdomains*. Biochem Soc Trans, 2019. **47**(5): p. 1327-1339.
31. Bork, N.I. and V.O. Nikolaev, *cGMP Signaling in the Cardiovascular System-The Role of Compartmentation and Its Live Cell Imaging*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(3).
32. Chen-Izu, Y., et al., *G(i)-dependent localization of beta(2)-adrenergic receptor signaling to L-type Ca(2+) channels*. Biophys J, 2000. **79**(5): p. 2547-56.
33. Davare, M.A., et al., *A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca²⁺ channel Cav1.2*. Science, 2001. **293**(5527): p. 98-101.
34. Fischmeister, R., et al., *Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases*. Circ Res, 2006. **99**(8): p. 816-28.
35. Buxton, I.L. and L.L. Brunton, *Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes*. J Biol Chem, 1983. **258**(17): p. 10233-9.
36. Hayes, J.S., L.L. Brunton, and S.E. Mayer, *Selective activation of particulate cAMP-dependent protein kinase by isoproterenol and prostaglandin E1*. J Biol Chem, 1980. **255**(11): p. 5113-9.
37. Di Benedetto, G., et al., *Protein kinase A type I and type II define distinct intracellular signaling compartments*. Circ Res, 2008. **103**(8): p. 836-44.
38. Scott, J.D., C.W. Dessauer, and K. Taskén, *Creating order from chaos: cellular regulation by kinase anchoring*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2013. **53**: p. 187-210.
39. Rich, T.C., et al., *Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion*. J Gen Physiol, 2000. **116**(2): p. 147-61.
40. Nikolaev, V.O., et al., *Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation*. Science, 2010. **327**(5973): p. 1653-7.
41. Agarwal, S.R., C.E. Clancy, and R.D. Harvey, *Mechanisms Restricting Diffusion of Intracellular cAMP*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 19577.

42. Mika, D., et al., *PDEs create local domains of cAMP signaling*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(2): p. 323-9.
43. Miller, C.L. and C. Yan, *Targeting cyclic nucleotide phosphodiesterase in the heart: therapeutic implications*. J Cardiovasc Transl Res, 2010. **3**(5): p. 507-15.
44. Patrucco, E., et al., *Phosphodiesterase 8A (PDE8A) regulates excitation-contraction coupling in ventricular myocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **49**(2): p. 330-3.
45. Richter, W., et al., *Conserved expression and functions of PDE4 in rodent and human heart*. Basic Res Cardiol, 2011. **106**(2): p. 249-62.
46. Zhang, M. and D.A. Kass, *Phosphodiesterases and cardiac cGMP: evolving roles and controversies*. Trends Pharmacol Sci, 2011. **32**(6): p. 360-5.
47. Knight, W.E. and C. Yan, *Cardiac cyclic nucleotide phosphodiesterases: function, regulation, and therapeutic prospects*. Horm Metab Res, 2012. **44**(10): p. 766-75.
48. Lee, D.I., et al., *Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease*. Nature, 2015. **519**(7544): p. 472-6.
49. Chen, S., et al., *A Novel Role of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 10A in Pathological Cardiac Remodeling and Dysfunction*. Circulation, 2020. **141**(3): p. 217-233.
50. Fischmeister, R., et al., *Species- and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2005. **142**(2): p. 136-43.
51. Goraya, T.A. and D.M. Cooper, *Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE1): current perspectives*. Cell Signal, 2005. **17**(7): p. 789-97.
52. Houslay, M.D., G.S. Baillie, and D.H. Maurice, *cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling*. Circ Res, 2007. **100**(7): p. 950-66.
53. Kritzer, M.D., et al., *AKAPs: the architectural underpinnings of local cAMP signaling*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(2): p. 351-8.
54. Calejo, A.I. and K. Tasken, *Targeting protein-protein interactions in complexes organized by A kinase anchoring proteins*. Front Pharmacol, 2015. **6**: p. 192.
55. Martins, T.J., M.C. Mumby, and J.A. Beavo, *Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues*. J Biol Chem, 1982. **257**(4): p. 1973-9.
56. Rybalkin, S.D., et al., *PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain*. Embo j, 2003. **22**(3): p. 469-78.
57. Sette, C. and M. Conti, *Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation*. J Biol Chem, 1996. **271**(28): p. 16526-34.
58. Mika, D., W. Richter, and M. Conti, *A CaMKII/PDE4D negative feedback regulates cAMP signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(7): p. 2023-8.
59. Krishnamurthy, S., et al., *Active site coupling in PDE:PKA complexes promotes resetting of mammalian cAMP signaling*. Biophys J, 2014. **107**(6): p. 1426-40.
60. Bobin, P., et al., *Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective*. Arch Cardiovasc Dis, 2016. **109**(6-7): p. 431-43.
61. Weber, S., et al., *PDE2 at the crossway between cAMP and cGMP signalling in the heart*. Cell Signal, 2017. **38**: p. 76-84.
62. Yang, Q., et al., *A novel cyclic GMP stimulated phosphodiesterase from rat brain*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **205**(3): p. 1850-8.
63. Rosman, G.J., et al., *Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase*. Gene, 1997. **191**(1): p. 89-95.

64. Russwurm, C., et al., *Dual acylation of PDE2A splice variant 3: targeting to synaptic membranes*. J Biol Chem, 2009. **284**(38): p. 25782-90.
65. Pandit, J., et al., *Mechanism for the allosteric regulation of phosphodiesterase 2A deduced from the X-ray structure of a near full-length construct*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(43): p. 18225-30.
66. Terasaki, W.L. and M.M. Appleman, *The role of cyclic GMP in the regulation of cyclic AMP hydrolysis*. Metabolism, 1975. **24**(3): p. 311-9.
67. Prigent, A.F., et al., *Comparison of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms from rat heart and bovine aorta. Separation and inhibition by selective reference phosphodiesterase inhibitors*. Biochem Pharmacol, 1988. **37**(19): p. 3671-81.
68. Bender, A.T., et al., *Differentiation of human monocytes in vitro with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor produces distinct changes in cGMP phosphodiesterase expression*. Cell Signal, 2004. **16**(3): p. 365-74.
69. Manns, J.M., et al., *Differential regulation of human platelet responses by cGMP inhibited and stimulated cAMP phosphodiesterases*. Thromb Haemost, 2002. **87**(5): p. 873-9.
70. Vettel, C., et al., *PDE2-mediated cAMP hydrolysis accelerates cardiac fibroblast to myofibroblast conversion and is antagonized by exogenous activation of cGMP signaling pathways*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014. **306**(8): p. H1246-52.
71. Stephenson, D.T., et al., *Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 2A in multiple mammalian species*. J Histochem Cytochem, 2009. **57**(10): p. 933-49.
72. Omori, K. and J. Kotera, *Overview of PDEs and their regulation*. Circ Res, 2007. **100**(3): p. 309-27.
73. Mongillo, M., et al., *Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway*. Circ Res, 2006. **98**(2): p. 226-34.
74. Vandecasteele, G., et al., *Cyclic GMP regulation of the L-type Ca(2+) channel current in human atrial myocytes*. J Physiol, 2001. **533**(Pt 2): p. 329-40.
75. Mehel, H., et al., *Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts beta-adrenergic responses in cardiomyocytes*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(17): p. 1596-606.
76. Sprenger, J.U., et al., *In vivo model with targeted cAMP biosensor reveals changes in receptor-microdomain communication in cardiac disease*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6965.
77. Perera, R.K., et al., *Microdomain switch of cGMP-regulated phosphodiesterases leads to ANP-induced augmentation of beta-adrenoceptor-stimulated contractility in early cardiac hypertrophy*. Circ Res, 2015. **116**(8): p. 1304-11.
78. Nikolaev, V.O., et al., *Real-time monitoring of the PDE2 activity of live cells: hormone-stimulated cAMP hydrolysis is faster than hormone-stimulated cAMP synthesis*. J Biol Chem, 2005. **280**(3): p. 1716-9.
79. Zoccarato, A., et al., *Cardiac Hypertrophy Is Inhibited by a Local Pool of cAMP Regulated by Phosphodiesterase 2*. Circ Res, 2015. **117**(8): p. 707-19.
80. Dittrich, M., et al., *Local response of L-type Ca(2+) current to nitric oxide in frog ventricular myocytes*. J Physiol, 2001. **534**(Pt 1): p. 109-21.
81. Assenza, M.R., et al., *Critical role of phosphodiesterase 2A in mouse congenital heart defects*. Cardiovasc Res, 2018. **114**(6): p. 830-845.
82. Maurice, D.H., et al., *Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases*. Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(4): p. 290-314.

83. Favot, L., et al., *VEGF-induced HUVEC migration and proliferation are decreased by PDE2 and PDE4 inhibitors*. Thromb Haemost, 2003. **90**(2): p. 334-43.
84. Lugnier, C., *Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents*. Pharmacol Ther, 2006. **109**(3): p. 366-98.
85. Surapisitchat, J., et al., *Differential regulation of endothelial cell permeability by cGMP via phosphodiesterases 2 and 3*. Circ Res, 2007. **101**(8): p. 811-8.
86. Dickinson, N.T., E.K. Jang, and R.J. Haslam, *Activation of cGMP-stimulated phosphodiesterase by nitroprusside limits cAMP accumulation in human platelets: effects on platelet aggregation*. Biochem J, 1997. **323** (Pt 2): p. 371-7.
87. Beavo, J.A., *Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms*. Physiol Rev, 1995. **75**(4): p. 725-48.
88. Yan, C., C.L. Miller, and J. Abe, *Regulation of phosphodiesterase 3 and inducible cAMP early repressor in the heart*. Circ Res, 2007. **100**(4): p. 489-501.
89. Movsesian, M., F. Ahmad, and E. Hirsch, *Functions of PDE3 Isoforms in Cardiac Muscle*. J Cardiovasc Dev Dis, 2018. **5**(1).
90. Meacci, E., et al., *Molecular cloning and expression of human myocardial cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(9): p. 3721-5.
91. Miki, T., et al., *Characterization of the cDNA and gene encoding human PDE3B, the cGIP1 isoform of the human cyclic GMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterase family*. Genomics, 1996. **36**(3): p. 476-85.
92. Wechsler, J., et al., *Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A in cardiac myocytes*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38072-8.
93. Kenan, Y., et al., *Functions of the N-terminal region of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 (PDE 3) isoforms*. J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 12331-8.
94. Shakur, Y., et al., *Membrane localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 (PDE3). Two N-terminal domains are required for the efficient targeting to, and association of, PDE3 with endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 2000. **275**(49): p. 38749-61.
95. Han, S.J., et al., *Protein kinase B/Akt phosphorylation of PDE3A and its role in mammalian oocyte maturation*. Embo j, 2006. **25**(24): p. 5716-25.
96. Pozuelo Rubio, M., et al., *Phosphodiesterase 3A binds to 14-3-3 proteins in response to PMA-induced phosphorylation of Ser428*. Biochem J, 2005. **392**(Pt 1): p. 163-72.
97. Hunter, R.W., C. Mackintosh, and I. Hers, *Protein kinase C-mediated phosphorylation and activation of PDE3A regulate cAMP levels in human platelets*. J Biol Chem, 2009. **284**(18): p. 12339-48.
98. Lugnier, C., et al., *Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms associated to isolated cardiac nuclei*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1472**(3): p. 431-46.
99. Leroy, M.J., et al., *Characterization of two recombinant PDE3 (cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterase) isoforms, RcGIP1 and HcGIP2, expressed in NIH 3006 murine fibroblasts and Sf9 insect cells*. Biochemistry, 1996. **35**(31): p. 10194-202.
100. Taira, M., et al., *Molecular cloning of the rat adipocyte hormone-sensitive cyclic GMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterase*. J Biol Chem, 1993. **268**(25): p. 18573-9.
101. Degerman, E., P. Belfrage, and V.C. Manganiello, *Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3)*. J Biol Chem, 1997. **272**(11): p. 6823-6.
102. Chung, Y.W., et al., *Targeted disruption of PDE3B, but not PDE3A, protects murine heart from ischemia/reperfusion injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(17): p. E2253-62.

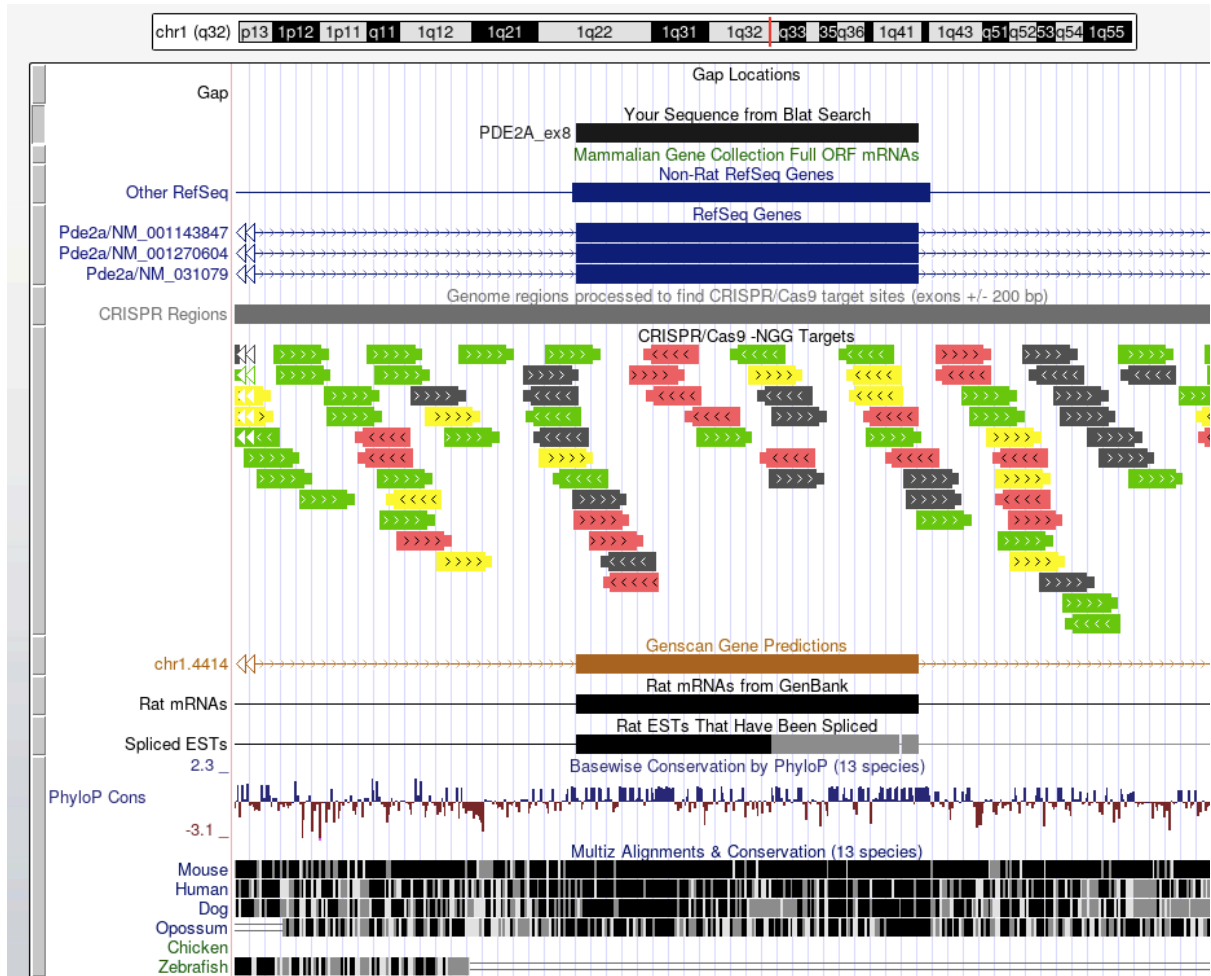
103. Movsesian, M.A., et al., *Sarcoplasmic reticulum-associated cyclic adenosine 5'-monophosphate phosphodiesterase activity in normal and failing human hearts*. J Clin Invest, 1991. **88**(1): p. 15-9.
104. Beca, S., et al., *Phosphodiesterase type 3A regulates basal myocardial contractility through interacting with sarcoplasmic reticulum calcium ATPase type 2a signaling complexes in mouse heart*. Circ Res, 2013. **112**(2): p. 289-97.
105. Ahmad, F., et al., *Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2 (SERCA2) activity by phosphodiesterase 3A (PDE3A) in human myocardium: phosphorylation-dependent interaction of PDE3A1 with SERCA2*. J Biol Chem, 2015. **290**(11): p. 6763-76.
106. Oikawa, M., et al., *Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A1 protects the heart against ischemia-reperfusion injury*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **64**: p. 11-9.
107. Vandeput, F., et al., *Selective regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A isoforms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(49): p. 19778-83.
108. Onuma, H., et al., *Identification of the insulin-regulated interaction of phosphodiesterase 3B with 14-3-3 beta protein*. Diabetes, 2002. **51**(12): p. 3362-7.
109. Palmer, D., et al., *Protein kinase A phosphorylation of human phosphodiesterase 3B promotes 14-3-3 protein binding and inhibits phosphatase-catalyzed inactivation*. J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9411-9419.
110. Ghigo, A., et al., *Phosphoinositide 3-kinase γ protects against catecholamine-induced ventricular arrhythmia through protein kinase A-mediated regulation of distinct phosphodiesterases*. Circulation, 2012. **126**(17): p. 2073-83.
111. Ghigo, A., et al., *PI3K and Calcium Signaling in Cardiovascular Disease*. Circ Res, 2017. **121**(3): p. 282-292.
112. Marcantoni, A., et al., *Phosphoinositide 3-kinase γ (PI3K γ) controls L-type calcium current (I_{Ca,L}) through its positive modulation of type-3 phosphodiesterase (PDE3)*. J Cell Physiol, 2006. **206**(2): p. 329-36.
113. Ding, B., et al., *A positive feedback loop of phosphodiesterase 3 (PDE3) and inducible cAMP early repressor (ICER) leads to cardiomyocyte apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(41): p. 14771-6.
114. Ding, B., et al., *Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure*. Circulation, 2005. **111**(19): p. 2469-2476.
115. Odagiri, K., et al., *Local control of mitochondrial membrane potential, permeability transition pore and reactive oxygen species by calcium and calmodulin in rat ventricular myocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 989-97.
116. Ahmad, F., et al., *Differential regulation of adipocyte PDE3B in distinct membrane compartments by insulin and the beta3-adrenergic receptor agonist CL316243: effects of caveolin-1 knockdown on formation/maintenance of macromolecular signalling complexes*. Biochem J, 2009. **424**(3): p. 399-410.
117. Ahmad, F., et al., *Insulin-induced formation of macromolecular complexes involved in activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B (PDE3B) and its interaction with PKB*. Biochem J, 2007. **404**(2): p. 257-68.
118. McManus, M.T. and P.A. Sharp, *Gene silencing in mammals by small interfering RNAs*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(10): p. 737-47.
119. Kim, Y.G., J. Cha, and S. Chandrasegaran, *Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(3): p. 1156-60.
120. Christian, M., et al., *Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases*. Genetics, 2010. **186**(2): p. 757-61.
121. Urnov, F.D., et al., *Genome editing with engineered zinc finger nucleases*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(9): p. 636-46.

122. Carroll, D., *Genome engineering with zinc-finger nucleases*. Genetics, 2011. **188**(4): p. 773-82.
123. Cho, S.W., et al., *Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(3): p. 230-2.
124. DiCarlo, J.E., et al., *Genome engineering in Saccharomyces cerevisiae using CRISPR-Cas systems*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(7): p. 4336-43.
125. Cong, L., et al., *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. Science, 2013. **339**(6121): p. 819-23.
126. Ding, Q., et al., *Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs*. Cell Stem Cell, 2013. **12**(4): p. 393-4.
127. Friedland, A.E., et al., *Heritable genome editing in C. elegans via a CRISPR-Cas9 system*. Nat Methods, 2013. **10**(8): p. 741-3.
128. Gratz, S.J., et al., *Genome engineering of Drosophila with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease*. Genetics, 2013. **194**(4): p. 1029-35.
129. Hwang, W.Y., et al., *Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(3): p. 227-9.
130. Jinek, M., et al., *RNA-programmed genome editing in human cells*. Elife, 2013. **2**: p. e00471.
131. Li, D., et al., *Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(8): p. 681-3.
132. Li, J.F., et al., *Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(8): p. 688-91.
133. Li, W., et al., *Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(8): p. 684-6.
134. Mali, P., et al., *RNA-guided human genome engineering via Cas9*. Science, 2013. **339**(6121): p. 823-6.
135. Nekrasov, V., et al., *Targeted mutagenesis in the model plant Nicotiana benthamiana using Cas9 RNA-guided endonuclease*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(8): p. 691-3.
136. Wang, H., et al., *One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering*. Cell, 2013. **153**(4): p. 910-8.
137. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science, 2012. **337**(6096): p. 816-21.
138. Wyman, C. and R. Kanaar, *DNA double-strand break repair: all's well that ends well*. Annu Rev Genet, 2006. **40**: p. 363-83.
139. Moehle, E.A., et al., *Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3055-60.
140. Orlando, S.J., et al., *Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(15): p. e152.
141. Chen, F., et al., *High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases*. Nat Methods, 2011. **8**(9): p. 753-5.
142. Santiago, Y., et al., *Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(15): p. 5809-14.
143. Bhaya, D., M. Davison, and R. Barrangou, *CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation*. Annu Rev Genet, 2011. **45**: p. 273-97.
144. Wiedenheft, B., S.H. Sternberg, and J.A. Doudna, *RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 331-8.

145. Horvath, P. and R. Barrangou, *CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea*. Science, 2010. **327**(5962): p. 167-70.
146. Terns, M.P. and R.M. Terns, *CRISPR-based adaptive immune systems*. Curr Opin Microbiol, 2011. **14**(3): p. 321-7.
147. Deltcheva, E., et al., *CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III*. Nature, 2011. **471**(7340): p. 602-7.
148. Brooker, G., et al., *Radioimmunoassay of cyclic AMP and cyclic GMP*. Adv Cyclic Nucleotide Res, 1979. **10**: p. 1-33.
149. Williams, C., *cAMP detection methods in HTS: selecting the best from the rest*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(2): p. 125-35.
150. Zacco, M., *Use of chimeric fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer to monitor cellular responses*. Circ Res, 2004. **94**(7): p. 866-73.
151. Förster, T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Annalen der Physik, 1948. **437**(1-2): p. 55-75.
152. Clegg, R.M., *Fluorescence resonance energy transfer*. Curr Opin Biotechnol, 1995. **6**(1): p. 103-10.
153. Hochreiter, B., A.P. Garcia, and J.A. Schmid, *Fluorescent proteins as genetically encoded FRET biosensors in life sciences*. Sensors (Basel), 2015. **15**(10): p. 26281-314.
154. Zacco, M. and T. Pozzan, *Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes*. Science, 2002. **295**(5560): p. 1711-5.
155. DiPilato, L.M., X. Cheng, and J. Zhang, *Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(47): p. 16513-8.
156. Nikolaev, V.O., et al., *Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation*. J Biol Chem, 2004. **279**(36): p. 37215-8.
157. Ponsioen, B., et al., *Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator*. EMBO Rep, 2004. **5**(12): p. 1176-80.
158. Rochais, F., et al., *Negative feedback exerted by cAMP-dependent protein kinase and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes: an in vivo study using adenovirus-mediated expression of CNG channels*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 52095-105.
159. Lehnart, S.E., et al., *Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias*. Cell, 2005. **123**(1): p. 25-35.
160. Warrier, S., et al., *Beta-adrenergic- and muscarinic receptor-induced changes in cAMP activity in adult cardiac myocytes detected with FRET-based biosensor*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(2): p. C455-61.
161. Fields, L.A., A. Koschinski, and M. Zacco, *Sustained exposure to catecholamines affects cAMP/PKA compartmentalised signalling in adult rat ventricular myocytes*. Cell Signal, 2016. **28**(7): p. 725-32.
162. Doench, J.G., et al., *Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation*. Nat Biotechnol, 2014. **32**(12): p. 1262-7.
163. Moreno-Mateos, M.A., et al., *CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo*. Nat Methods, 2015. **12**(10): p. 982-8.
164. Mohamed, T.M.A., et al., *Plasma membrane calcium pump (PMCA4)-neuronal nitric-oxide synthase complex regulates cardiac contractility through modulation of a compartmentalized cyclic nucleotide microdomain*. J Biol Chem, 2011. **286**(48): p. 41520-41529.
165. Wachten, S., et al., *Distinct pools of cAMP centre on different isoforms of adenylyl cyclase in pituitary-derived GH3B6 cells*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 1): p. 95-106.

166. Sin, Y.Y., et al., *Disruption of the cyclic AMP phosphodiesterase-4 (PDE4)-HSP20 complex attenuates the beta-agonist induced hypertrophic response in cardiac myocytes.* J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(5): p. 872-83.
167. Herget, S., M.J. Lohse, and V.O. Nikolaev, *Real-time monitoring of phosphodiesterase inhibition in intact cells.* Cell Signal, 2008. **20**(8): p. 1423-31.
168. Stangherlin, A., et al., *cGMP signals modulate cAMP levels in a compartment-specific manner to regulate catecholamine-dependent signaling in cardiac myocytes.* Circ Res, 2011. **108**(8): p. 929-39.
169. Richter, W., et al., *beta1-adrenergic receptor antagonists signal via PDE4 translocation.* EMBO Rep, 2013. **14**(3): p. 276-83.
170. Gerard, G.F., et al., *Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA.* Mol Biotechnol, 1997. **8**(1): p. 61-77.
171. Nolan, T., R.E. Hands, and S.A. Bustin, *Quantification of mRNA using real-time RT-PCR.* Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1559-82.
172. Moein, S., et al., *Identification of Appropriate Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis in Long-term Hypoxia-treated Kidney Cells.* Adv Biomed Res, 2017. **6**: p. 15.
173. Julian, G.S., et al., *Analysis of the stability of housekeeping gene expression in the left cardiac ventricle of rats submitted to chronic intermittent hypoxia.* J Bras Pneumol, 2016. **42**(3): p. 211-4.
174. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
175. Sambrook, J. and D.W. Russell, *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins.* CSH Protoc, 2006. **2006**(4).
176. Sprenger, J.U., et al., *FRET microscopy for real-time monitoring of signaling events in live cells using unimolecular biosensors.* J Vis Exp, 2012(66): p. e4081.
177. Banyasz, T., et al., *Transformation of adult rat cardiac myocytes in primary culture.* Exp Physiol, 2008. **93**(3): p. 370-82.
178. Judd, J., J. Lovas, and G.N. Huang, *Isolation, Culture and Transduction of Adult Mouse Cardiomyocytes.* J Vis Exp, 2016(114).
179. Nguyen, P.D., et al., *Enrichment of neonatal rat cardiomyocytes in primary culture facilitates long-term maintenance of contractility in vitro.* Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **303**(12): p. C1220-8.
180. Piper, H.M., S.L. Jacobson, and P. Schwartz, *Determinants of cardiomyocyte development in long-term primary culture.* J Mol Cell Cardiol, 1988. **20**(9): p. 825-35.
181. Zaccolo, M., A. Zerio, and M.J. Lobo, *Subcellular Organization of the cAMP Signaling Pathway.* Pharmacol Rev, 2021. **73**(1): p. 278-309.
182. DiBianco, R., et al., *A comparison of oral milrinone, digoxin, and their combination in the treatment of patients with chronic heart failure.* N Engl J Med, 1989. **320**(11): p. 677-83.

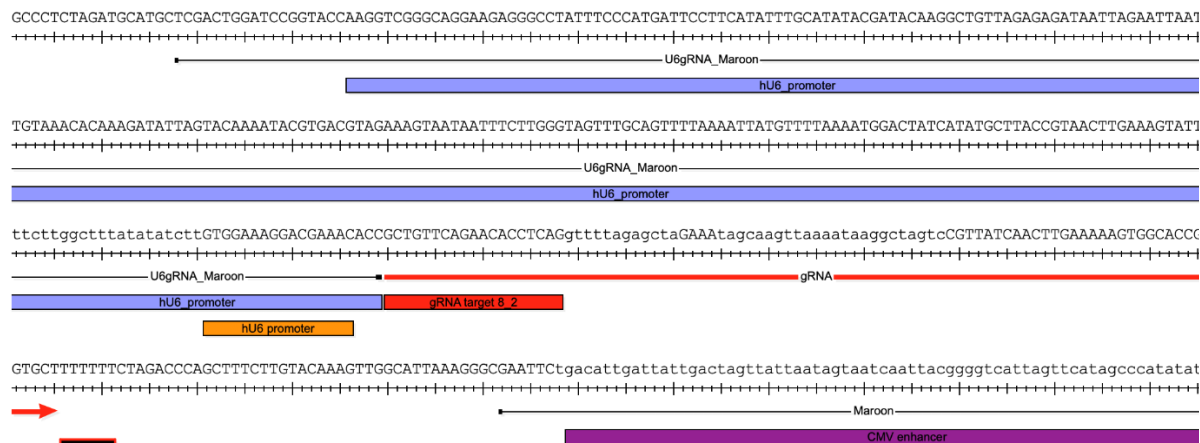
APPENDIX



App. Abbildung 1: gRNS Design
Der „Genome Browser UCSC“ wurde zur Selektion passender gRNS-target Sequenzen verwendet. Als Beispiel dient das 8 Exon des PDE2A-Gens und die dazu passende gRNS-target Sequenzen.

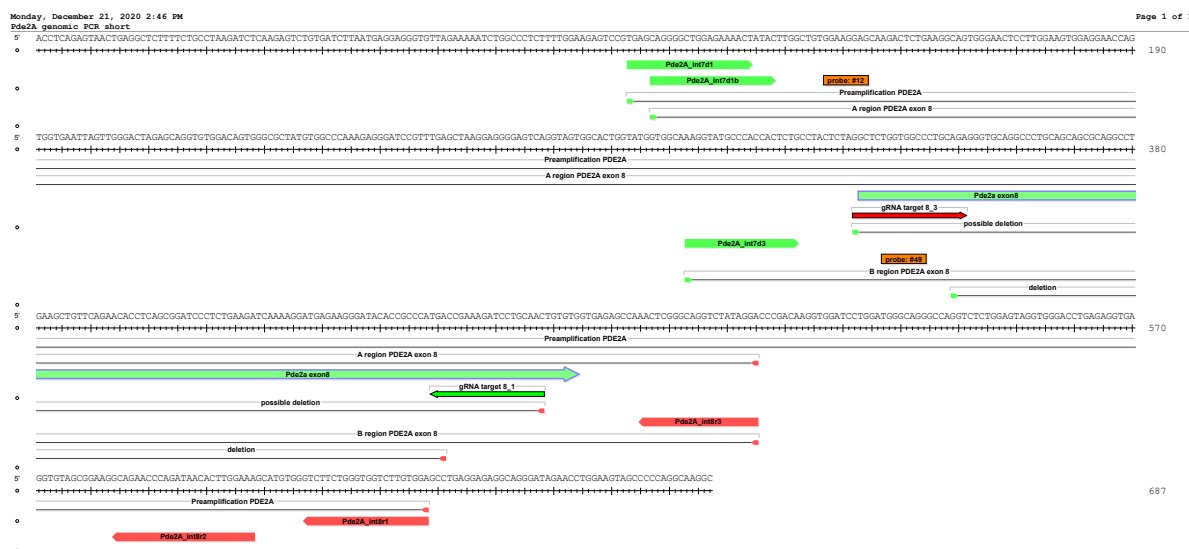
Guide Sequence	ATCTTCAGAGGGATCCGCTG
Protospacer Adjacent Motif (PAM)	AGG
MIT Guide Specificity Score	83
Efficiency: Doench et al. 2016 Score	84% (61)
Efficiency: Moreno-Mateos (In-vitro) Score	83% (63)
Efficiency: Doench et al 2014 Score	31
Bae et al. Out-of-Frame Score	64

App. Abbildung 2: gRNS Design
Der „Genome Browser UCSC“ wurde zur Selektion passender gRNS-target Sequenzen verwendet. Die wichtigsten Qualitätskriterien der gRNS sind die „Doench et al. 2016“ und „Moreno-Mateos (In-vitro) Scores. Als Beispiel dient das Oligonukleotid PDE2AnRNA8_1d.



App. Abbildung 3: gRNS Design

Mittels „DNASeq“ Ließen sich die gRNS projektieren. Der hU6 Promotor wurde unmittelbar vor die gRNS-target Sequenz kloniert. Als Beispiel dient die gRNS PDE2A_8_1



App. Abbildung 4: Nachweis eines Knockouts auf Ebene der DNS

Dargestellt ist die Auswahl geeigneter Taqman-Sonden (orangene) für die Taqman-PCR. Als Beispiel dient die gRNS PDE2A_8_1

App. Abbildung 5: Klonierung der gRNS

App. Abbildung 6: Klonierung der gRNS

App. Abbildung 7: Kontrolle des KO auf Ebene der RNS

App. Abbildung 8: Kontrolle des KO auf Ebene der RNS

DANKSAGUNG

Ich möchte meinem Doktorvater, Prof. Dr. rer. nat. Viacheslav Nikolaev, dem Institutsdirektor des Zentrums für experimentelle Medizin und Herz-Kreislaufforschung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, herzlich danken. Vielen Dank für deine Betreuung, für die ausgiebigen gemeinsamen Besprechungen der Experimente und die Entwicklung eines umfassenden Gesamtkonzepts. Selbst in späten Abendstunden warst du bereit, auch auf anspruchsvolle Fragen einzugehen.

Die Etablierung einer neuen Methode ist keine leichte Aufgabe. Auf diesem Weg mussten zahlreiche Herausforderungen gemeistert werden. Nicht selten benötigten bedeutende Ergebnisse viel Zeit und erforderten ein flexibles Denkmuster für deren Optimierung. Dennoch habe ich nie daran gezweifelt, dass ich unter deiner Führung erfolgreich die Doktorarbeit vollenden würde.

Du hast dich bei jeder Gelegenheit darum bemüht, die wissenschaftliche Arbeit weiter zu verbessern. Sei es durch die Registrierung meiner Teilnahme als Redner bei wissenschaftlichen Kongressen, die interdisziplinäre Zusammenarbeit mit anderen Laboren, die herausragende Expertise in der Gen-Editierung besitzen, oder meine Beteiligung an einem Graduiertenkolleg.

An dieser Stelle möchte ich dem Graduiertenkolleg CVRC meinen Dank aussprechen. Insbesondere Prof. Lucie Carrier und Prof. Dr. med Thomas Eschenhagen haben durch ihre hervorragende Organisation die richtige Balance aus Druck und Motivation gefunden. Dadurch wurden nicht nur Fähigkeiten im wissenschaftlichen Arbeiten vermittelt, sondern auch umfassende Praxis in der Präsentation unserer Ergebnisse vor einem großen und kritischen Publikum ermöglicht.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an die Mitarbeiter des Labors: Kirstie A. De Jong, Dr. phil. Hariharan Subramanian, Dr. rer. nat. Nadja I. Bork, Dr. rer. nat. Alexander Froese, Prof. Dr. rer. nat. Cristina Molina, Roberta Kurelic und Viktoria Hänel. Ihr seid ein gut aufeinander abgestimmtes Team mit einem immensen theoretischen Wissen und Know-how. Bei Experimenten, die im ersten Anlauf nicht funktionierten, konnte ich stets auf euren Rat zählen. Ihr hattet immer kluge Ideen oder kreative Denkansätze zur Lösung der Probleme parat. Die Zeit, die ich im Labor mit euch verbracht habe, sei es bei wissenschaftlichen Arbeiten oder außerhalb, bei Grillabenden oder Feiern, werde ich in guter Erinnerung behalten. Ihr habt mir nicht nur das experimentelle Arbeiten beigebracht, sondern auch wichtige Lebenslektionen.

Der wichtigste Dank gilt meiner Familie. Ihr habt mich auf dem gesamten Weg begleitet. Euch sind die Anstrengungen am meisten bekannt. Danke an meinen Vater für deine wissenschaftliche Expertise und Kommentare. Danke an meine Mutter und Schwester für eure Unterstützung. Eure Ratschläge waren für mich vom allergrößten Wert und ich weiß euch sehr zu schätzen.

LEBENS LAUF



SCHULISCHER WERDEGANG

2004 bis 2008	Grundschule St. Theresia Münster
2008 bis 2016	Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium Münster

STUDIUM

Seit Oktober 2017	Studium Humanmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)
Juni 2024	Fachsemester: 13, Urlaubssemester: 1 erfolgreicher Abschluss im Sommersemester 24

FORSCHUNG

2016 bis 2017 2016	Aushilfskraft im Institut für experimentelle Pathologie, Universitätsklinikum Münster (UKM) Abgeschlossener Kursus der Versuchstierkunde
Promotion	Universitätsklinikum Hamburg
Publikationen	Skryabin, E.B., et al., <i>CRISPR/Cas9 Knock-Out in Primary Neonatal and Adult Cardiomyocytes Reveals Distinct cAMP Dynamics Regulation by Various PDE2A and PDE3A Isoforms</i> . Cells, 2023. 12(11).

SPRACHKENNTNISSE

Russisch; Muttersprache, erworbenes telc-Zertifikat: Niveau B2
Deutsch; zweite Muttersprache
Englisch; erworbenes Cambridge ESOL-Zertifikat: Niveau C1

QUALIFIKATIONEN

2011	Teilnahme am <i>Förder-Förder Projekt</i> , Internationales Centrum für Begabungsforschung, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
2016	3. Preis im Landeswettbewerb Jugend forscht, Thema: Die Klonierung der gRNS für die CRISPR/Cas9 Nukleasen des Npr3 Rezeptor Gens
2006 - 2016	Teilnahme an Jugend Musiziert in Solo und Ensemble-Wertung mit mehreren 3 – 1 Preisen auf Landes und Bundesebene, Instrument: klassische Gitarre
2006 - 2023	4. <i>Kyū-Grad</i> im Shōtōkan-Karate
2020	Freiwilliges „Blockseminar EKG-Grundkurs“

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: